



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

工學博士 學位論文

생물전기화학 혐기성소화에 의한 석탄의 고율
메탄전환

Bioelectrochemical anaerobic digestion for high-rate methane
conversion of coal

指導教授 宋 永 彩

2019年 8月

韓國海洋大學校 大學院

土木環境工學科

朴 冬 梅

本 論文을 朴冬梅의 工學博士 學位論文으로 認准함.

委員長	金 仁 洙
委 員	張 在 秀
委 員	蔡 奎 正
委 員	金 東 勳
委 員	宋 永 彩



2019년 07월

韓國海洋大學校 大學院

목 차

목 차	i
List of Tables	v
List of Figures	vi
Abstract	viii
제1장: 서론	1
1.1 연구배경	1
1.2 연구목적	4
1.3 연구범위 및 내용	4
제2장: 문헌연구	7
2.1 석탄	7
2.1.1 석탄의 생성과 석탄의 분류	7
2.1.2 석탄의 이용	9
2.1.3 석탄의 매장량 및 생산과 소비	10
2.1.4 저등급 석탄	14
2.1.4 저등급 석탄의 생물학적 메탄전환	15
2.2 혐기성 소화조	20
2.2.1 혐기성 소화조의 개요	20
2.2.2 혐기성 소화의 영향인자	25
2.2.3 혐기성 소화의 장점	29
2.3 생물전기화학 혐기성 소화	30
2.3.1 생물전기화학 혐기성 소화의 작동 원리	30
2.3.2 생물전기화학 혐기성 소화의 영향인자	31

제3장: 석탄의 생물학적 메탄전환의 생물전기화학적 증진34

3.1 서론34

3.2 재료 및 방법36

 3.2.1 석탄 및 식종 슬러지36

 3.2.2 실험장치37

 3.2.3 혐기성 독성실험38

 3.2.4 분석 및 결과 해석39

3.3 결과 및 고찰41

 3.3.1 정전기장에서 석탄의 생물전기화학적 메탄전환41

 3.3.2 석탄의 가수분해 생성물의 메탄전환 가능성48

 3.3.3 시사점52

3.4 결론53

제4장: 효모 추출물과 혐기성 슬러지는 전계의 환경에서 석탄의 생물전기화학적 메탄전환을 크게 개선한다55

4.1 서론55

4.2 재료 및 방법57

 4.2.1 석탄 및 효모 추출물 및 접종물57

 4.2.2 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조58

 4.2.3 분석 및 결과 해석60

 4.2.4 DNA 추출 및 미생물 분석61

4.3 결과 및 고찰62

 4.3.1 석탄의 생물전기화학적 메탄전환62

 4.3.2 석탄의 생물전기화학적 가수분해 및 발효66

 4.3.3 미생물 군집71

 4.3.4 시사점78

4.4 결론87

제5장: 석탄의 생물전기화학적 메탄전환에 대한 물 전기분해의

영향80

5.1 서론80

5.2 재료 및 방법82

 5.2.1 석탄, 효모 추출물 및 혐기성 슬러지82

 5.2.2 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조83

 5.2.3 DNA 추출 및 미생물 분석85

 5.2.4 분석 및 결과 해석86

5.3 결과 및 토의87

 5.3.1 정전기장에서의 석탄의 메탄전환87

 5.3.2 생물전기화학적 석탄의 가수분해 및 발효91

 5.3.3 정전기장에 노출 된 벌크용액의 Cyclic voltammogram95

 5.3.4 미생물군집96

 5.3.5 시사점104

5.4 결론105

제6장: 석탄의 생물전기화학적 메탄전환에 대한 활성탄의

영향106

6.1 서론106

6.2 재료 및 방법108

 6.2.1 석탄, 효모 추출물 및 혐기성 슬러지108

 6.2.2 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조109

 6.2.3 DNA 추출 및 미생물 분석111

 6.2.4 분석 및 결과 해석111

6.3 결과 및 토의113

 6.3.1 생물전기화학 혐기성 소화조의 정전기장에서의
 석탄의 메탄전환113

6.3.2 생물전기화학적 석탄의 가수분해 및 발효	118
6.3.3 정전기장에 노출 된 벌크용액의 Cyclic voltammogram	123
6.3.4 벌크용액의 임피던스	125
6.3.5 미생물군집	128
6.3.6 시사점	134
6.4 결론	136
제7장: 종합결론 및 향후 연구	137
7.1 요약 및 종합결론	137
7.2 향후 연구과제	140
참고문헌	142

List of Tables

Table 2.1 Typical Parameters of Coals	9
Table 2.2 Use of coal	10
Table 2.3 Total proved reserves of world coal at end 2017(million tons)	11
Table 2.4 Coal production by region (million tons)	12
Table 2.5 Coal consumption by region (million toe)	13
Table 2.6 Substrates and products for the main anaerobic microbes	21
Table 2.7 Status of bioelectrochemical anaerobic digestion according to few representative studies	32
Table 3.1 Summary of biogenic conversion of coal to methane in bioelectrochemical anaerobic reactor	48
Table 3.2 Summary of the anaerobic toxicity of the hydrolysis product of coal to methane conversion	52
Table 4.1 Methane conversion of coal in bioelectrochemical reactors exposed to an electrostatic field	67
Table 4.2 Diversity indices for microbial species in bioelectrochemical anaerobic reactors	72
Table 5.1 Methane conversion of coal in bioelectrochemical reactors exposed to an electrostatic field	92
Table 5.2 Redox peaks in Cyclic voltammogram	96
Table 5.3 Diversity indices for microbial species in bioelectrochemical anaerobic reactor	98
Table 6.1 Methane conversion of coal in bioelectrochemical reactors exposed to an electrostatic field	119
Table 6.2 Redox peaks in Cyclic voltammogram	125
Table 6.3 Electrochemical properties in EIS for the bulk solution.	126
Table 6.4 Diversity indices for microbial species in bioelectrochemical anaerobic reactor	129

List of Figures

Fig. 2.1. Coal Formation	7
Fig. 2.2. World energy consumption projections	14
Fig. 2.3. Representative microorganisms decomposing coal	16
Fig. 2.4. Schematic of the sequential microbial degradation of coal to produce methane	18
Fig. 2.5. Biological conversion of lignite ABCDE mechanism	19
Fig. 2.6. Anaerobic degradation pathway of polymeric biomass to methane	22
Fig. 2.7. Schematic diagram of hydrolysis model.	23
Fig. 2.8. Schematics of bioelectrochemical anaerobic digestion.	31
Fig. 3.1. Schematic diagram of the bioelectrochemical anaerobic batch reactor	38
Fig. 3.2. Cumulative methane production in bioelectrochemical anaerobic	44
Fig. 3.3. Daily changes in (a) methane production and (b) hydrogen production	46
Fig. 3.4. Cyclic voltammogram in the bulk solution for different applied voltages	47
Fig. 3.5. (a) Cumulative methane production and (b) the inhibition to the methane production depending on the amount of the coal hydrolysis product added in the anaerobic toxicity test	50
Fig. 4.1. Schematic diagram of bioelectrochemical anaerobic batch reactor	59
Fig. 4.2. (a) Cumulative methane production from coal and (b) methane yield of coal enhanced by yeast extract and an electric field(0.67V/cm)	65
Fig. 4.3. Excitation/Emission Matrix for hydrolyzed products (a) BER67, (b) BER17, (c) Control, and (d) EEM Indices	69
Fig. 4.4. Cyclic voltammogram in the initial batch experiment for the conversion of coal to methane	70

Fig. 4.5. Microbial abundance at the genus level a) bacteria, b) archaea	73
Fig. 4.6. Biplot for the microbial species communities in the bulk solution a) Non coated electrode and b) Coated electrode.	76
Fig. 5.1. Schematic deagram of the bioelectrochemical anaerobic batch reactor a) bacteria, b) archaea.	84
Fig. 5.2. Cumulative methane production from coal in Initial batch and Additional batch.	90
Fig. 5.3. Methane yield of coal in IE67 and OE67.	91
Fig. 5.4. Excitation Emission Matrix for hydrolyzed products a) Control, b) IE67, c) OE33, d) OE67 and e) EEM Indices.	94
Fig. 5.5. Cyclic voltammogram in the initial batch experiment for the methane conversion of coal.	96
Fig. 5.6. Microbial abundance at the genus level: a) bacteria and b) archaea	100
Fig. 5.7. Biplot for the microbial species communities in the bulk solution: a) bacteria, b) archaea	103
Fig. 6.1. Schematic deagram of the bioelectrochemical anaerobic batch reactor	110
Fig. 6.2. Cumulative methane production from coal a)Initial batch and b) Additional batch.	117
Fig. 6.3. Methane yield of coal in AE67	118
Fig. 6.4. Excitation Emission Matrix for hydrolyzed products a) Control, b) AE00, c) AE33, d) AE67 and e) EEM Indices	122
Fig. 6.5. Cyclic voltammogram in the initial batch experiment for the methane conversion of coal.	124
Fig. 6.6. a) Bode plot and b) Nyquist plot for the electrochemical impedance spectra in the bulk solution.	127
Fig. 6.7. Microbial abundance at the genus level: a) bacteria and b) archaea.	130
Fig. 6.8. Biplot for the microbial species communities in the bulk solution: a) bacteria, b) archaea.	133

생물전기화학 혐기성소화에 의한 석탄의 고율 메탄 전환

朴 冬 梅

Department of Civil and Environmental Engineering
Korea Maritime and Ocean University

Abstract

Coal is one of the abundant energy resources widely distributed on the earth, and has contributed greatly to human civilization so far. However, coal is a polluting energy source that releases a large amount of greenhouse gases and dust in the combustion process. On the other hand, the pollutant emission of natural gas is known to be 200 to 500% less than the coal. Therefore, the paradigm of global energy consumption is gradually shifting to clean energy sources including natural gas. The conversion of coal to the natural gas is an essential for securing a stable and sustainable energy source. The main component of natural gas is methane. Coal can be converted to methane through two routes: thermochemical conversion and biological conversion. The thermochemical conversion is a high energy consumption process that requires high temperature and pressure conditions. The biological conversion of coal is an environmentally friendly process that uses anaerobic microorganisms to converts coal to methane under mild conditions of low temperature and pressure. Recent interest in methane as a clean energy source has led to the research on the biological

conversion of coal to methane. To date, the biological coal conversion has been improved by the bioavailability improvement of coal, biostimulation, and bioaugmentation. However, the methane yield obtainable from 1 g of coal is still only a few tens of μL to a few mL. The bioelectrochemical anaerobic digestion is an emerging technology that converts organic matter to methane by direct interspecies electron transfer (DIET) in an anaerobic reactor with the electrode pair that are polarized by an external power source. In terms of the kinetics and thermodynamics, it has been found that the limitations in anaerobic digestion could be considerably mitigated in bioelectrochemical anaerobic digestion. However, the bioelectrochemical methane conversion of coal has not yet been studied at all.

In this thesis, therefore, the following topics were studied to improve the methane conversion of coal; i) an electrostatic field that enhances DIET, ii) the yeast extract as a biostimulant, iii) oxygen that promotes the opening of the aromatic rings, and iv) activated carbon as a mediator for DIET.

The bioelectrochemical methane conversion of coal was greatly improved under the electrostatic field. The methane yield of coal reached 54.5 mL/g lignite under the electrostatic field of 0.33 V/cm, which was 10.5 times higher than the value reported to the best of our knowledge, but it took long lag phase for the substantial production of methane. However, the lag phase can be reduced in the electrostatic field of 0.67 V/cm higher than the 0.33 V/cm. Interestingly, after the methane production from coal, the soluble organic residue composed of the coal degradation intermediates was still high as above 3,600 mg COD/L in the bulk solution. In the anaerobic toxicity test, it has been revealed that the coal degradation intermediates inhibit the conversion of coal to

methane. However, the inhibition of the intermediates on the further conversion to methane could be mitigated by the dilution, and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was 17.5%. The additional methane yield of 55.3 mL/g lignite was obtained from the intermediates when it was diluted 10-fold. It has been concluded that the biological conversion of coal to methane can be significantly improved under the electrostatic field over than 0.33 V/cm, and the dilution of the coal degradation intermediates further improves the methane potential of coal. The electroactive microbial species were enriched in coal medium amended with yeast extract by the electrostatic field of 0.67 V/cm. The electrostatic field promoted DIET between the electroactive species to immediately produce methane from coal. However, the methane production was gradually suppressed by accumulating toxic intermediates, and the methane yield was 25.1 mL/g lignite. When yeast extract and anaerobic sludge were supplemented, methane was produced from the intermediates again and the total methane yield reached 109.9 mL/g lignite, which was the maximum known yield. This suggests that the bioelectrochemical methane conversion of coal can be significantly improved under the electrostatic field of 0.67 V/cm by amending and then supplementing the coal medium with both yeast extract and anaerobic sludge.

It has been proved that the oxygen that released from the water electrolysis can be used as an electron acceptor to stimulates the ring opening of the heterocyclic aromatic intermediates of coal degradation, thereby promoting methane conversion. In this experiment, the pairs of ordinary electrodes (OE) and surface-insulated electrodes (IE) were placed in a bioelectrochemical anaerobic batch reactors, respectively, and the electrodes were polarized by applying voltages (0.5, 1.0 and 2.0 V

for OE, 2.0 V for IE). The cumulative methane production in the OE with the applied voltage of 2.0 V was slowly saturated to 162.9 mL, which is higher than 136.0 mL in the IE reactor. This indicates that the oxygen from the water electrolysis in OE was served as an electron acceptor to stimulate the ring-opening reaction of the heterocyclic aromatic compounds contained in the coal degradation products. When methane production from OE and IE was saturated by accumulation of toxic coal degradation intermediates, anaerobic medium amended with yeast extract and anaerobic sludge were supplemented to the reactor. The cumulative methane production increased abruptly in IE and was significantly higher than in OE. The total methane yield of coal was 121.0 mL/g lignite in IE and much higher than 64.4 mL/g lignite of OE. This suggests that coal can be effectively hydrolyzed and fermented under the electrostatic field in IE, and the conversion of coal degradation intermediates to methane through biological DIET can be promoted by supplementing yeast extract and anaerobic sludge.

The influence of activated carbon on the bioelectrochemical methane conversion of coal was investigated under the electrostatic field ranged from 0.17 V/cm to 0.67 V/cm. Under the electric field of 0.67 V/cm, the methane yield of coal with activated carbon was 35.0 mL/g lignite, which was slightly higher than the 25.1 mL/g lignite without activated carbon. After supplementing anaerobic medium amended with yeast extract and anaerobic sludge, the total methane yield of coal increased to 98.0 mL/g lignite within 19 days. This suggests that activated carbon improves the methane conversion rate of coal by mediating the DIET for methane production.

The final conclusions are that the electroactive species in the coal medium amended with yeast extract as a biostimulant can be enriched

from anaerobic sludge under the electrostatic field of 0.67 V/cm, and the DIET between the electroactive species greatly improves methane conversion of coal. The activated carbon further improves the methane conversion of coal by mediating the DIET. Further studies are still needed to replace the yeast extract as a biostimulant with an inexpensive substance, and to design the continuous bioelectrochemical system for coal, but the findings of this thesis would be greatly contributed to the practical use of the biological methane conversion of coal.

KEY WORDS: Coal 석탄; Methane 메탄; Bioelectrochemical Conversion 생물전기화학적 전환; Direct Interspecies Electron Transfer(DIET) 직접종간전자전달; Yeast extract 효모 추출물; Electrostatic Field 전기장

제 1 장 서 론

1.1 연구배경

전 세계 에너지 생산량의 30%를 차지하고 있는 석탄은 제철산업, 발전산업 등에서 핵심연료로 활용되고 있다(Huang et al., 2013). 그러나 석탄을 연료로 할 때 탄소연소와 질소, 황의 연소도 동반하므로 분진과 이산화탄소, 황산화물, 질소산화물과 같은 공해물질이 발생한다(Zhang et al., 2016; Ryu et al., 1993; Yi et al., 2017). 따라서, 인류사회의 주요 에너지원으로 활약중이던 석탄은 현재 오염 에너지원으로 분류되고 있으며 사용량이 점차 감소하고 있다(Park & Liang, 2016). 안정적인 자원 확보와 지속가능한 에너지 요구를 감안할 때 매장량이 풍부한 석탄을 청정한 에너지로 전환시켜 온실가스 및 미세먼지의 방출량을 저감시키는 기술은 매우 매력적이다.

메탄은 천연가스의 주요성분이며 메탄이 연소하면서 방출하는 오염물질은 불과 석탄의 20%~50%이므로 석탄의 메탄전환기술에 대한 경제적 및 환경적 관심이 세계적으로 주목을 끌고 있다(U.S. Energy Information Administration, 2017a, 2017b). 석탄의 메탄전환은 열화학적 전환방법과 생화학적 전환방법의 두가지 경로가 있다. 석탄의 열화학적 메탄전환방법은 고온고압에서 가스화하는 방법으로 에너지 소비가 크며 대형장치산업으로 시스템비용이 고가이며 설비의 구성과 제어가 복잡하다. 반면 석탄의 생화학적 메탄전환은 미생물 특유의 전기적활성으로 저온 저압에서 진행되므로 열화학적방법에 비해 1) 환경친화적이고 2) 에너지사용량이 낮으며 3) 산물 선택도가 우수하여 높은 탄소 수율을 얻을 수 있다. 그러나, 혐기성미생물에 의한 석탄의 메탄전환 생성속도는 매우 느리며, 메탄의 생성 수율이 아주 작다 (Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017). 메탄을 상업적으로 이용하기 위해서는 석탄의 메탄전환속도와 메탄 수율을 향상시키는 것이 중요하다. 지금까지 석탄의 생물학적 메탄전환반응을 향상시키기 위하여 ABCDE공법을 비롯한 다양한 방법들이 시도되었다(Na and Park, 2016; Zhang et al., 2016; Fuertez et al., 2017; Davis et al., 2018b). 그러나 1g의 석탄에서 얻을 수 있는 메탄 수율은 여전히 수십 μ L에서 수 mL에 불과하였다

(Bao et al., 2016; Zheng et al., 2017; Wang et al., 2017; Fuertez, et al., 2017). 유기물의 혐기성분해과정을 살펴보면 고분자유기물이 가수분해되어 단당류로 전환되고 단당류들은 산생성균들에 의해 초산과 수소와 같은 중간생성물로 발효된 뒤 메탄생성균에 의해 초산과 수소가 메탄으로 전환된다 (Shin and Song, 1995). 유기물의 혐기성분해반응에 영향을 미치는 가장 중요한 인자는 유기물의 물리화학적인 특성이다. 석탄은 탄화가 완료되었거나 탄화가 진행 중인 고형물로서 석탄에 함유된 (메탄으로 전환 가능한) 유기물은 주로 리그닌과 같은 소수성 물질들이다(Colosimo et al., 2016; Senthamaraikkannan et al., 2016; Strapoc et al., 2011). 따라서 석탄은 혐기성 미생물에 의해 메탄으로의 전환이 어려운 물질이다. 석탄의 생물학적인 메탄전환과정에는 다양한 석탄의 분해반응들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 이러한 반응들은 extracellular enzymatic depolymerization, hydroxylation, carboxylation, methylation 및 methanogenesis 등을 포함한다 (Strapoc et al., 2011). 석탄의 메탄전환과정에서 생성되는 중간생성물들은 대부분 미생물들이 이용하기 어려운 다환 방향 탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), 방향족 질소 화합물 및 지방족 화합물과 같은 화합물들이다 (Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017; Nzila, 2018). 석탄의 메탄전환에 관여하는 미생물은 이들 중간생성물들에 의한 독성에 의해 성장이 억제되어 메탄생성반응이 정상적으로 일어날 수 없었다 (Piao et al., 2018). 따라서, 석탄의 분해과정에서 생성되는 중간생성물들의 분해를 촉진시키고 메탄생성을 활성화시키는 미생물을 주입하는 생물증식(bioaugmentation)의 방법이 시도되어 왔다(Ghosh et al., 2014; Davis et al., 2018). 미생물에 대한 석탄의 생체이용율증가(bioavailability)를 향상시키기 위하여 석탄을 분쇄하여 입경을 감소시키는 방법, 공극율을 높이는 방법, 계면활성제를 주입하는 방법도 석탄의 메탄전환율을 향상시키기 위한 전략으로 사용되었다(Zhang et al., 2016; Fuertez, et al., 2017; Davis et al., 2018b). 또한, 석탄은 미생물의 성장에 필요한 질소, 인, 미량원소, 비타민과 같은 무기영양분이 결핍된 물질이다. 따라서, 질소, 인과 같은 영양분을 주입하여 혐기성미생물의 성장과 활성을 촉진시키는 생체자극(biostimulation)의 방법이 석탄의 메탄전환효율을 향상시킬 수 있었다 (Zhang J & Liang Y 2017; Zhang J et al., 2018). 특히, 다양한 영양분을

함유하고 있는 효모 추출물은 석탄의 메탄전환율을 향상시키는데 도움이 되었다. 그리고 방향족 화합물들은 전자수용체인 산소가 존재할 때 방향족 고리(aromatic ring)를 산화시키거나 방향족의 핵(aromatic nucleus)에 분자상태의 산소를 추가함으로써 ring이 opening되어 분해된다 (Sharma, et al., 2016; Nzila, 2018). 하여 최근에는 석탄의 분해과정에 필요한 전자수용체를 공급하는 호기성 전처리방법도 연구되고 있다 (Wang et al., 2017). 그러나, 여전히 석탄에서 전환되는 메탄의 수율은 상업적으로 경제성을 가지기에는 너무 낮았다 (Zhang J & Liang Y 2017; Zhang J et al., 2018).

생물전기화학 혐기성소화조에서는 혐기성분해반응의 한계로 여겨져 왔던 동력학 및 열역학적인 한계들이 중간직접전자전달을 통한 메탄생성에 의해 상당히 완화될 수 있다 (Song et al., 2004; Feng et al., 2016; Feng et al., 2018). 전극 표면에서 일어나는 산화환원반응의 열역학적인 자유에너지 변화량은 전기적인 분극에 의해 달라진다. 생물전기화학 혐기성소화에서는 이러한 전기화학원리를 유기물의 혐기성분해반응을 개선하기 위하여 이용한다 (Song et al., 2016; Feng et al., 2018a). 혐기성소화조에 전기적으로 분극된 전극쌍을 설치하면 산화/환원 전극 표면에 exoelectrogens와 electrotrophic methanogens 와 같은 전기활성균들이 각각 성장한다 (Doyle et al., 2015; Zhao et al., 2016; Feng et al., 2018a). 이들 전기활성균은 cytochrome C를 세포외벽까지 확장시켜 전자를 외부로 직접전달하거나 외부에서 전자를 직접받는 균이다 (Shrestha et al., 2014; Song et al., 2016). electrotrophic methanogens는 exoelectrogens로부터 전자를 직접받아 이산화탄소를 환원시킴으로써 메탄을 생성하는 균이다 (Doyle et al., 2015; Feng et al., 2018a). 최근 exoelectrogens와 electrotrophic methanogens 들은 분극 전극의 표면 뿐만 아니라 분극 전극들 사이의 전기장에 의해 벌크용액에서도 enrich 하는 것으로 밝혀지고 있다 (Feng et al., 2018a; Feng et al., 2018b). exoelectrogens와 electrotrophic methanogens 사이의 전자전달은 전극이나 전도성물질을 통하거나 직접접촉에 의하여 일어난다 (Rotaru et al., 2014; Shrestha et al., 2014; Feng et al., 2018b).

지금까지의 연구를 요약해보면 혐기성소화조에서 석탄의 생화학적 메탄전환에

대한 연구는 많이 진행이 되었지만 석탄의 생물전기화학적 메탄전환에 대해서는 아직 연구된 바가 없다. 석탄의 생물전기화학 메탄전환기술은 산업경제화를 실현하는데 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

1.2 연구목적

본 연구는 현장에서 적용할 수 있는 있는 환경 친화적이고 지속 가능한 접근방식인 석탄의 생물학적 메탄전환을 위한 실용적인 기술을 개발하기 위해 진행되었다. 생물전기화학원리를 혐기성분해기술에 적용하여 분극된 절연전극을 설치한 생물전기화학 혐기성소화조에서 갈탄의 혐기성분해반응에 의한 메탄생성량을 처음으로 조사하였다. 석탄의 생물학적 메탄 수율이 낮은 원인을 밝히기 위해 독성실험을 실시하여 석탄의 메탄전환반응을 제한하는 율속단계를 평가하였으며, 메탄생성반응에 대한 가수분해 및 산발효 중간생성물들의 저해효과를 평가하였다. 또한 석탄의 메탄전환단계에서 긴 지체기간을 단축화시키고 미생물에게 영양을 공급하여 활성을 극대화하기 위해 생물전기화학 혐기성소화조에서 효모 추출물의 주입이 전기장에 의한 DIET을 통한 석탄의 메탄전환율에 미치는 영향을 조사하였다. 그리고 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 추가적인 메탄전환을 위해 효모 추출물과 혐기성 슬러지를 보충함으로써 메탄전환율을 향상시킬 수 있음을 증명하였다. 소화조 내부에서 전극표면에 있는 물을 전기분해시켜 전자수용체인 산소를 생성시킴으로서 방향족 화합물의 ring opening을 통한 석탄의 메탄 수율에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 전도성물 질인 활성탄을 추가하여 각 전계조건 하에 DIET을 통한 석탄의 메탄전환율에 미치는 영향을 비교하였다.

1.3 연구범위 및 내용

본 연구의 목적을 수행하기 위해 본 연구의 범위와 내용은 다음과 같은 4가지로 구성된다.

① 석탄의 생물학적 메탄전환의 생물전기화학적 증진

석탄의 생물전기화학적 메탄전환율을 조사하기 위해 캐나다산 갈탄을 준비하여 함수율, VS/TS, COD 등 물리적 특성을 조사하였다. Cylindrical acrylic resin을 이용하여 생물전기화학 혐기성소화조를 설계 제작하고 벌크용액(혐기성 슬러지, 무기영양분, 갈탄) 내부 미생물 사이의 DIET에 대한 전계효과를 조사하기 위해 반응조 내부에 설치한 전극표면을 유전체를 이용하여 코팅하였다. 그리고 외부 직류전원을 이용하여 1V 및 2V의 전압을 전극 사이에 각각 인가하고 전압을 인가하지 않은 대조구와 석탄을 주입하지 않은 블랭크를 동일한 조건에서 운전하여 메탄전환을 조사하고 비교하였다.

또한 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 메탄전환에 대한 독성을 규명하기 위해 혈청병에 생물전기화학 혐기성소화조에서 채취한 잔류유기물을 각각 10%, 20%, 40% 주입하여 혐기성조건에서 메탄발생량을 측정하고 비교하였으며 저해작용을 평가하였다.

② 효모 추출물과 혐기성 슬러지는 전계의 환경에서 석탄의 생물전기화학적 메탄전환을 크게 개선한다.

생물전기화학 혐기성소화조를 설계 제작하고 효모 추출물을 1g/L의 농도로 주입하여 벌크용액을 개질하여 효모 추출물이 전계환경에서 미생물 사이의 DIET를 자극하여 메탄발생속도와 메탄전환율을 상당히 증진시켰음을 증명하였다. 그리고 전기활성미생물의 종류 및 풍부도와 균일성을 분석하고 해석하였다. EEM 분석을 통하여 전기장의 세기가 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 분해에 미치는 영향을 추측하였고 중간생성물의 정성을 분석하였다.

또한 효모 추출물과 식중균을 보충함으로써 석탄의 가수분해 및 산발효 유기잔류물에서 메탄의 추가적인 발생을 관측하고 현장에서의 사용여부를 확인하였다.

③ 석탄의 생물전기화학적 메탄전환에 대한 물 전기분해의 영향

생물전기화학 혐기성소화조를 설계 제작하고 코팅되지 않은 전극을 사용하여 전극표면에서 일어나는 물의 전기분해 산물이 석탄에 함유되어있는 다환성 방

향족 화합물의 ring opening에 주는 영향이 메탄전환에 미치는 영향을 조사하고 코팅된 전극을 사용한 반응조에서의 메탄 수율과 비교하였다.

또한 앞에 실험에서 얻은 경험으로 효모 추출물과 식중균을 보충함으로써 코팅된 전극이 설치된 소화조와 코팅되지 않은 전극이 설치된 소화조에서의 메탄추가생성량을 조사하고 비교하였다.

④ 석탄의 생물전기화학적 메탄전환에 대한 활성탄의 영향

생물전기화학 혐기성소화조의 벌크용액에 3.0g/L 농도의 전도성을 가진 활성탄을 주입하고 각각 0.17 V/cm와 0.33 V/cm, 0.67 V/cm의 전기장이 형성되도록 전압을 인가하였다. 그리고 전압을 인가하지 않은 반응조와 활성탄을 주입하지 않은 대조구를 같은 조건에서 운전하고 메탄발생량을 관측하고 비교하여 활성탄의 영향을 조사하였다. exoelectrogenic bacteria 와 electrotrophic methanogenic archaea 사이의 전자전달경로를 Cyclic voltammogram를 통하여 증명하였으며 Electrochemical Impedance Spectroscopy를 통하여 고주파와 저주파에서 벌크용액내부의 인피던스를 측정하여 전반 시스템의 저항을 분석하였다.

제 2 장 문헌연구

2.1 석탄

2.1.1 석탄의 생성과 석탄의 분류

석탄은 지표에 퇴적된 유기물질이 물리 화학적 변화에 의해 탄화되어 생성된 물질로서 지질시대의 육생식물이나 수생식물이 수중에 퇴적하여 매몰된 후 충분한 열과 압력을 받아 변질하여 생성된 퇴적암이다(Fig 2.1).

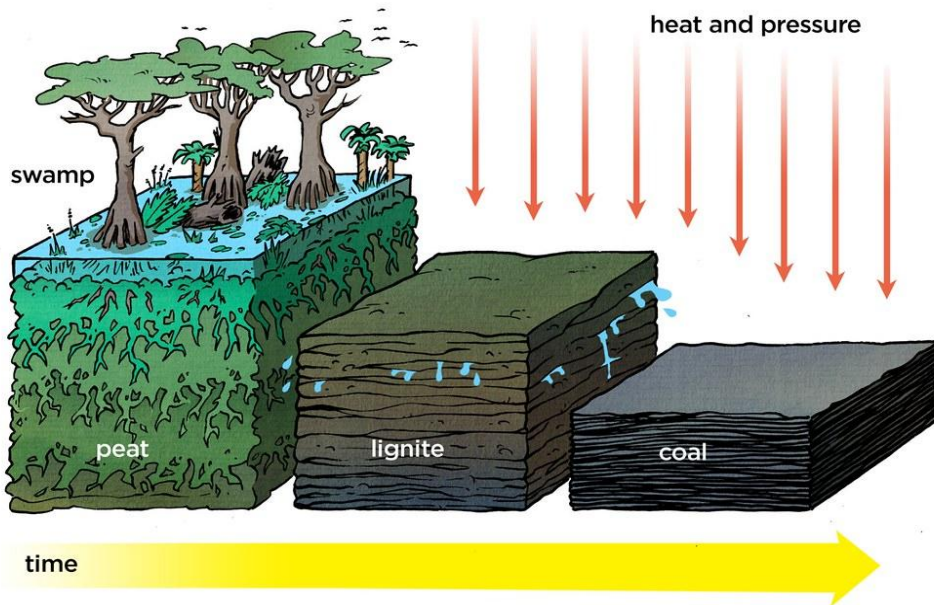


Fig 2.1. Coal Formation
(Source: Siyavula Education)

석탄의 생성과정을 살펴보면 삼림과 식물들이 흙과 모래속에 파묻히고 물에 잠겨 공기와의 접촉이 차단되면서 부식이 진행되지 않는 상태에서 수백만년동안 지압과 지열을 받으면서 가압, 건류작용을 받아 석탄화가 진행된 산물이다 (Energy Korea).

석탄은 탄화된 정도에 따라 이탄, 아탄, 갈탄, 역청탄, 무연탄으로 나눌수 있다. 이탄은 식물질의 주성분인 리그닌, 셀룰로오스 등이 지표에서 분해작용을 받은 것이다. 아탄은 탄화도가 낮은 갈탄의 일종으로 학술적으로는 갈색갈탄이라고 한다. 갈탄은 석탄중에서 가장 탄화도가 낮은 석탄, 흑갈색을 띠며 탄소성분이 70%로 낮기 때문에 원목의 형상, 나이테, 줄기 등의 조직이 보이는 경우가 많다. 다른 탄에 비하여 고정탄소의 함량이 적고 물기에 젖기 쉽고, 건조하면 가루가 되기 쉽다. 이러한 물리화학적 특성으로 인해 생물학적 메탄전환에 많이 이용된다. 역청탄은 암흑색의 유리광택 또는 수지광택이 있는 석탄으로 흑탄이라고도 하며 발열량(Calorific value)이 최대값을 보인다(Lee and Kim, 2008). 하여 역청탄은 제철용 코크스, 도시가스로 이용되며 최근에는 수소의 첨가, 가스화 등의 연구가 발달되어 석탄화학공업의 중요한 자원이다. 무연탄은 탄화가 가장 잘 되어 연기를 내지 않고 연소하는 석탄을 말한다. 점화점이 490℃로 불이 잘 붙지 않지만 화력이 강하고 일정한 온도를 유지하면서 연소된다. 각 종류의 석탄의 물리화학적 성질은 다음과 같은 주요한 기준으로 분별한다(정선군 석탄 산업사).

- (1) 수분: 110℃로 1시간 건조 후 증발하는 수분량을 말하는데 탄화도가 증가할수록 수분함량은 감소한다.
- (2) 휘발분: 950℃로 7분간 가열한 후 감소하는 량을 말하는데 탄화도가 증가할수록 휘발분은 감소한다.
- (3) 회분: 석탄을 태우고 난 잔류물을 가르킨다..
- (4) 고정탄소: 석탄 속의 고체 탄소를 가르키며 휘발성분, 회분, 수분을 제외한 양이다.
- (5) 유황분: 석탄 속의 황산화물(SO₂)로써 가능한 적은 양이 포함될수록 좋다.
- (6) 발열량: 석탄 1g을 태워서 얻는 열량(cal)인데 석탄의 발열량은 보통 4000~8000Kcal/Kg이다.

많이 사용되고 있는 갈탄, 역청탄, 무연탄의 탄질기준은 Table1과 같다(Kim, 2015).

Table 2.1 Typical Parameters of Coals

Class/group	Carbon (%)	Fixed Carbon (%)	Hydrogen (%)	Volatile Matter (%)	Gross Calorific (MJ/Kg)
Anthracite	95~98	92~98	2.9~3.8	2~8	>32.5
Bituminous					
Low Volatile					
Medium	91~92	80~85	4.2~4.6	14~22	>32.5
High	87~92	70~80	4.6~5.2	22~31	>32.5
Volatile					
High	82.5~87	60~70	5.0~5.6	>31	26.7~32.5
Low-grade	78~82.5	55~60	5.2~5.6		19.3~26.7
Lignite	73~78	50~55	5.2~5.6	41.76	<19.3

2.1.2 석탄의 이용

석탄은 직접 또는 혼합원료로 전기에너지 및 열에너지로 이용되기도 하고 고체화, 가스화 및 액화하여 연료, 원료, 합성천연가스등으로 이용된다(Table 2.2). 석탄의 가스화 및 액화는 석탄을 직접 연소하지 않고 합성가스로 전환시키거나 액체연료로 전환시키기 때문에 온실가스의 주범으로 되는 질소산화물과 황산화물을 저감시킬 수 있는 장점이 있다. 하지만 석탄의 가스화, 액화과정은 고온고압에서 열화학적 방법으로 석탄을 전환시키는 프로세스로서 에너지 소비 및 이산화탄소의 방출을 동반하며 처리과정에 오염물질을 제거하는 정제공정을 거쳐야 한다. 또한 생산에 이용되는 대규모의 설비시스템비용은 고가일 뿐만 아니라 설비의 구성과 제어가 복잡하다. 따라서, 지속 가능한 인류 사회 유지를 위해서는 전환 시 에너지투입을 최소화하여 온실가스 등 오염물질 발생을 억제하고 목적 산물의 선택도를 극대화 할 수 있는 고효율 청정 전환 기술개발이 요구된다.

Table 2.2 Use of coal

원료	이용형태	이용분야	구체용도
에너지 원료	직접 또는 혼합원료	발전	전기에너지, 회이용(Fly ash, 정수용)
		연소	열에너지, 회이용(경량골재, 시멘트)
석탄 원료	고체로 이용	건류코크	제철, 주물용, 일반연료
		성형코크	카바이트, 아세틸렌, 가스화연료, 합성화학원료
		부활	활성탄(기상, 액상흡착제)
		탄화	전극, 탄소재, 탄소계분차 / Carbon black
		산화	휴민산, 방향족캐빈산
	기체로 이용	건류가스	도시가스, 합성천연가스(SNG), 연료
		가스화	가스화발전 아세틸렌(Plasma가스화) 합성화학원료 액체연료
	액체로 이용	건류 Tar	특수연료(Jet연료, 고로분사) Tar화학, 합성화학원료, 염료 액체연료(가솔린, Jet연료)
		액화	용제처리탄(STC), SRC, Binder, 탄소섬유, 방향족chemicals
		할로겐화	윤활유, 유기불소화합물
용제처리		팽윤탄, 방향족chemicals	

2.1.3 석탄의 매장량 및 생산과 소비

전 세계 에너지량의 30%에 달하는 석탄의 총 매장량은 고등급 석탄인 무연탄과 유연탄이 7,183억톤이며, 저등급 석탄인 아역청탄과 갈탄이 3,167억톤, 합계 10350억톤으로 확인된다(BP Statistical Review of World Energy 2018)(Table

2.3). 이는 앞으로 약 200여년을 채굴 할 수 있는 양이다. 하지만 향후 예상 추가 매장량인 24203억톤을 감안하면 잠재적인 확인 매장량은 더욱 증가할 것으로 예상된다. 이같이 석탄 자원량은 풍부할 뿐만 아니라 세계 각지에 널리 분포하여 장기적으로 안정적인 공급이 기대되고 있다.

Table 2.3 Toral proved reserves of world coal at end 2017(million tons)

	Anthracite and bituminous	Sub-bituminous and lignite	Total	R/P ratio
North America	226306	32403	258709	335
S. & Cent America	8943	5073	14016	141
Europe	24220	76185	100405	159
CIS	130162	93066	223228	397
Middle East & Africa	14354	66	14420	53
Asia Pacific	314325	109909	424234	79
Total World	718310	316702	1035012	134

세계의 석탄 생산은 석탄 소비의 성장 둔화와 함께 점진적으로 감소되는 경향을 보이고 있다. 세계의 석탄 생산은 2007년에 3302.4백만톤에서 2017년에는 3768.6백만톤으로 10년동안 14%의 증가에 그치고 있지만 최근 5년동안은 오히려 3.6% 감소되었다(Table 2.4). 같은 화석연료인 석유도 마찬가지로 10년동안 11%의 증가율을 가지고 있지만 반면에 천연가스의 생산 증가율은 25%로써 석탄이나 석유에 비해 높은 생산 증가율을 보이고 있다.

석탄은 탄소화합물의 집합체로서 열을 가하면 연소하면서 에너지를 발산하기에 제철산업, 발전산업 등에서 핵심연료로 활용 중이다(Huang et al., 2013). 석탄을 구성하는 화학성분은 주로 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌, 탄분, 단백질 등이며 지방, 수지, 광물질외에 수소 산소 질소 황 등 무기물이 포함되어 있다. 그 외 유화철, 탄산마그네슘과 칼슘, 염화알칼리 등 미량의 원소를 함유하고 있으므로 석탄은 연료로 사용중에 먼지, 황산화물, 산화 질소, 이산화탄소와

같은 여러 가지 오염 물질을 사용 중에 발생시킨다(Zhang and Liang, 2016; Ryu et al., 1993; Yi et al., 2017).

Table 2.4 Coal production by region (million tons)

	2002	2007	2012	2017
North America	1072.2	601.3	534.9	407.9
S. & Cent America	53.8	55.9	65.9	66.8
Europe		216.6	199.2	164.6
CIS	1161.0	221.5	260.3	271.8
Middle East & Africa	231.0	141.6	152.6	155.3
Asia Pacific	2314.7	2065.5	2697.0	2702.3
Total World	4832.7	3302.4	3909.8	3768.6

석탄연소는 CO₂의 배출량이 높을 뿐만 아니라 천연 가스의 연소와 비교하여 약 450% 많은 NO_x, 500% 많은 CO 및 400% 이상의 미립자 배출을 초래한다(U.S. Energy Information Administration, 2017a, 2017b). 때문에 석탄은 미래 에너지인 동시에 기후변화 및 환경오염의 주범으로 여겨지고 있다. 하여 세계의 석탄 소비는 1980년 후반 이후 성장이 둔화되고 있다. 석탄 소비는 2007년에 3451.8mtoe(million tonnes oil equivalent)에서 2017년에는 3731.5mtoe으로 10년 동안 8%의 증가에 그치고 있다(Table 2.5). 또한 북미와 유럽, 유러시아의 석탄 소비량은 오히려 하락하고 있으며 전 세계 연료에너지의 소비량 추이를 보면 석탄은 감소하는 전망이다(Fig 2.2). 같은 화석연료인 석유의 소비량 역시 지난 10년동안 불과 11%의 증가율을 보였으나 반면 온실가스 방출이 상대적으로 적은 천연가스의 소비량은 지난 10년동안 24%의 증가율을 보이고 있다(BP Statistical Review of World Energy 2018).

Table 2.5 Coal consumption by region (million toe)

	2007	2012	2017
North America	586.2	449.9	363.8
S. & Cent America	25.8	31.6	32.7
Europe	372.9	347.3	296.4
CIS	167.3	182.1	157.0
Middle East & Africa	101.9	107.9	101.6
Asia Pacific	2197.6	2675.5	2780.0
Total World	3451.8	3794.5	3731.5

따라서 안정적이고 지속가능한 에너지 자원 확보를 위해 매장량이 풍부한 석탄을 청정한 에너지로 전환시키는 기술이 매우 필요하다. 미국, 일본, 유럽, 호주 등 나라를 비롯한 세계 여러나라들에서는 이미 석탄의 고품위화 및 전환 기술 연구가 증가되고 있으며 특히 에너지 소비가 적고 환경친화적인 석탄의 생물학적 메탄전환의 기술연구가 시작되고 있다.

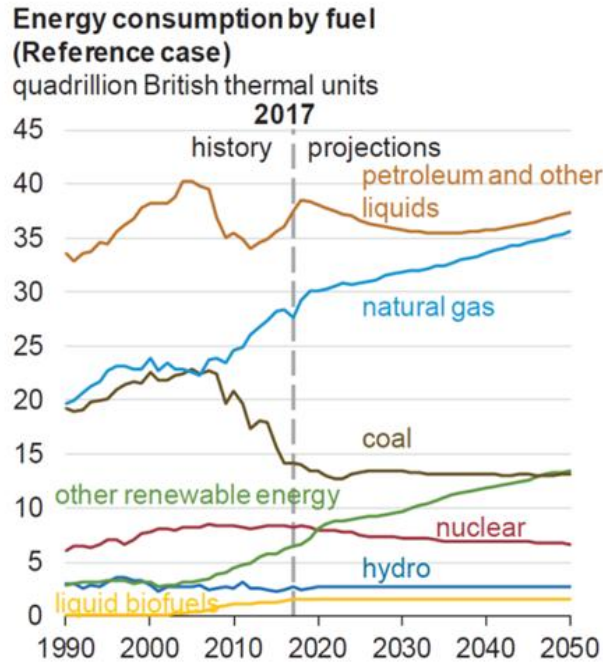


Fig 2.2. World energy consumption projections
(Source: US energy information administration)

2.1.4 저등급 석탄

석탄은 탄화도에 따라 아탄, 갈탄, 역청탄, 무연탄으로 분류되며 석탄에 함유된 휘발분, 고정탄소, 고유수분, 발열량 등을 지표로 한다. 저등급 석탄의 확인된 가채 매장량은 3,167억톤으로 고등급 석탄 매장량은 44%에 달한다. 하지만 고정탄소의 함량이 60% 이하이며 발열량이 6000kcal/kg 보다 작고 회분함량이 많으며 수분함량이 30~70%로써 기존의 열화학적 방법의 적용이 어렵기 때문에 풍부한 자원을 가지고 있음에도 불구하고 활용되지 못하고 있었다. 최근 석탄 주요 생산국인 중국과 인도의 고도성장으로 인해 발전용 석탄사용이 급증하면서 석탄수출이 제한되고 있어 대량 확보가 가능하지만 경제성이 낮아 활용이 이루어지지 않고 있던 잠재자원인 저등급 석탄이 새로운 에너지원으로 부각되

고 있다.

아탄, 갈탄과 아역청탄은 저등급 석탄에 분류되며 아탄은 탄화도가 낮은 갈탄의 일종으로 학술적으로는 갈색갈탄이라고 한다. 갈탄은 석탄중에서 가장 탄화도가 낮은 석탄으로 흑갈색을 띠며 탄소성분이 70%로 낮기 때문에 원목의 형상, 나이트, 줄기 등의 조직이 보이는 경우가 많다. 다른 탄에 비하여 고정탄소의 함량이 적고 물기에 젖기 쉽고, 건조하면 가루가 되기 쉽다. 이러한 물리화학적 특성으로 인해 생물학적 메탄전환에 많이 이용된다. 경제적 환경적 현안 해결을 위하여 저등급 석탄 고품위화 기술이 필수적이며, 보다 친환경적인 생물학적 메탄전환 기술은 안정적이고 지속가능한 에너지 확보에 아주 큰 기여를 할 것이다.

2.1.5 저등급 석탄의 생물학적 메탄전환

석탄의 생물학적 메탄전환은 Bacteria와 Archaea 모두를 함유한 다양한 미생물 군집(Fig 2.3)에 의해 혐기성 조건에서 연속적으로 진행되는 프로세스로서 낮은 온도 낮은 압력의 온화한 환경에서 낮은 에너지 소비의 환경친화적인 기술공정이다. 하지만 석탄의 생물학적 메탄전환 기술개발은 현재까지 메탄생성속도가 매우 낮고(메탄생성지체기간: 30~85days) 메탄 수율 또한 적기(갈탄의 경우 메탄 수율: 0.17~4.98mL/g lignite) 때문에 경제적으로 실용화 불가능한 상태에 머물러 있다(Colosimo et al., 2016; Zhang et al., 2016; Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017).

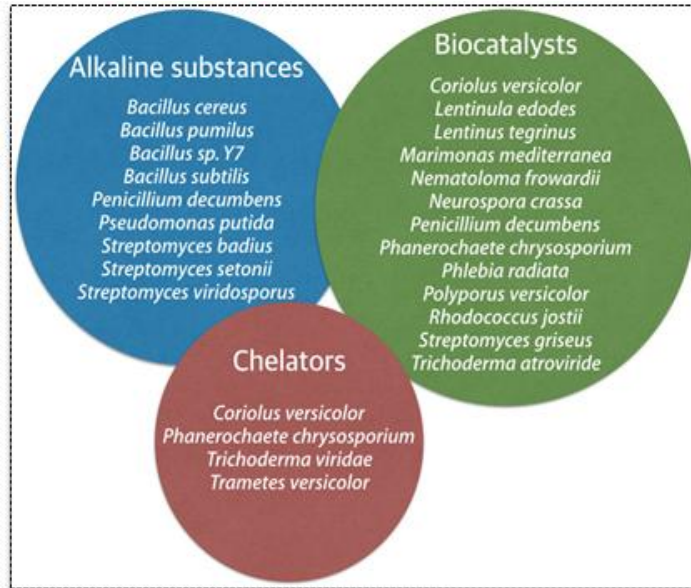
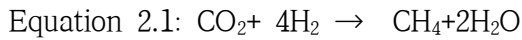


Fig 2.3. Representative microorganisms decomposing coal
(source: Na and Park, 2016).

석탄은 탄화가 완료되었거나 탄화가 진행 중인 고형물로서 석탄에 함유된 유기물은 주로 리그닌과 같이 소수성 물질들로써(Colosimo et al., 2016; Senthamaraiikkannan et al., 2016; Strapoc et al., 2011) 일반적인 유기물질에 비해 혐기성 미생물에 의한 메탄으로의 전환에 이상적인 기질은 아니며 그 구조가 까다롭다(Colosimo et al., 2016). 석탄의 생물학적 메탄전환과정에는 다양한 석탄의 분해반응들이 관여하는 것으로서 Bacteria에 의해 가수분해되거나 단당류 및 저분자 물질로 분해되고(Colosimo et al., 2016; McInerney et al., 2008; Schink, 2015) 분해된 단순 부산물은 Archaea에 의해 혐기성 상태에서 메탄으로 전환되는 기질로 된다(Guo et al., 2017; Haider et al., 2013). Fig 2.4에 표시된 바와 같이 석탄분해 시 대표적인 1차 중간생성물질은 polyaromatic hydrocarbons, nomoaromatic carboxylic acids, ketones, long-chain fatty acids, hydrocarbons 등과 같은 난 분해성 물질로서 메탄생성의 율속단계로 알려지고 있다(Wang et al., 2017). 이 석탄전환의 메커니즘을 보면 석탄의 구조를 붕괴시

키는 알칼리 물질(A: alkaline substances), 생촉매(B: Biocatalysts), 킬레이터(C: Chelators), 계면활성제(D: Detergent), 에스터 분해 효소(E: Esterase)에 의해 순차적이면서도 병렬적으로 진행이 된다(Fig 2.5). 저분자 물질로 분해된 단순 부산물들은 Archaea균에 의해 메탄으로 생성되는데 그 메탄생성 경로는 hydrogenotrophic (Eq. 2.1), acetoclastic (Eq. 2.2), methylotrophic (Eq. 2.3)의 세 가지 반응이다.



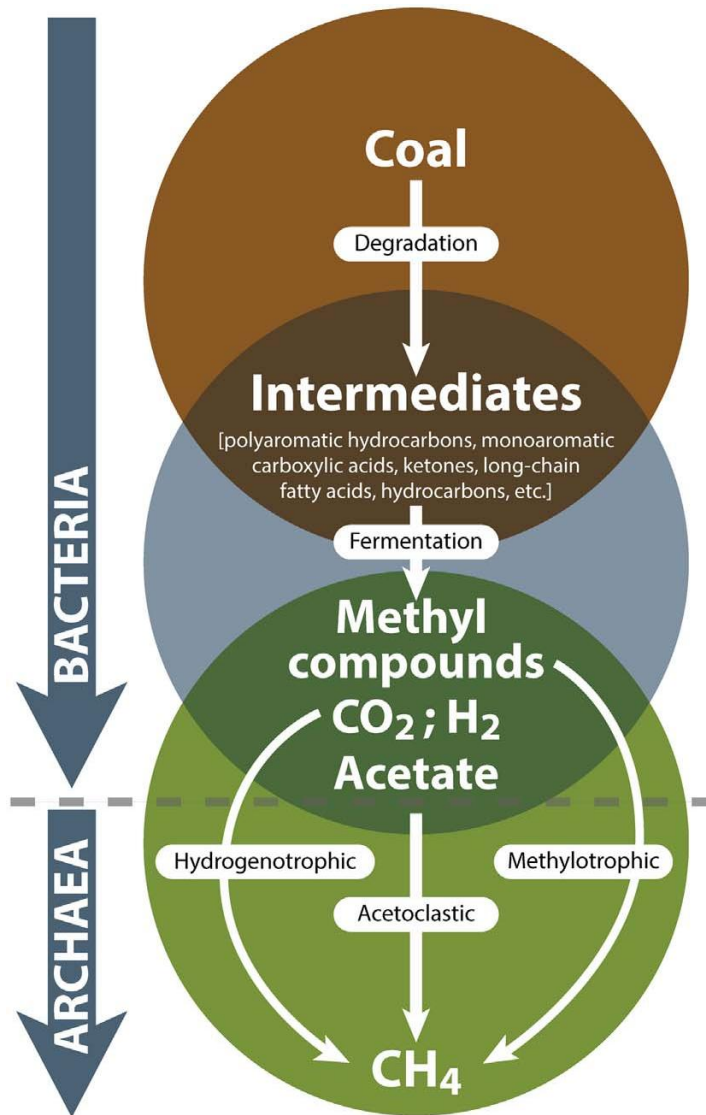


Fig 2.4. Schematic of the sequential microbial degradation of coal to produce methane(Moore, 2012; Schink, 2005; Strapoć et al., 2011).

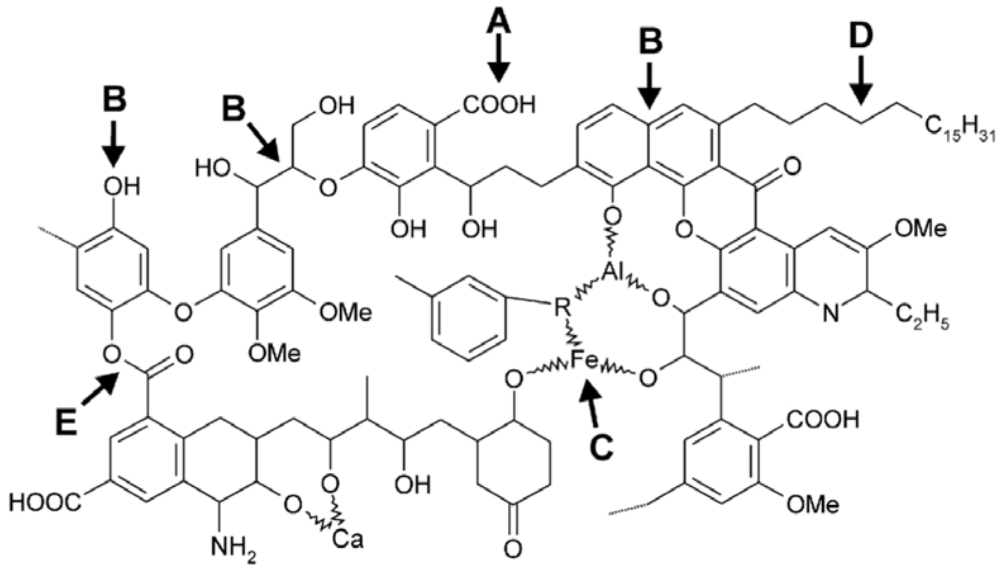


Fig. 2.5. Biological conversion of lignite ABCDE mechanism (Hofrichter and Fakoussa, 2001).

생물학적 메탄 생산은 석탄의 종류와 품질, 입자크기, 전처리 방법, 미생물 복합체의 특성에 따라 좌우된다. 갈탄이나 아역청탄과 같은 저등급 석탄은 분자 내에 산소를 일부 포함하고 있어 미생물 복합체의 접근이 비교적 용이하다 (Harris, 2008). 미생물에 의해 전환되는 메탄 수율을 증진시키기 위한 전략은 주로 생물증식(bioaugmentation), 생체 이용율을 높이기 위한 석탄처리(bioavailability), 그리고 메탄전환에 기여하는 미생물에게 영양소를 공급하는 생체자극(biostimulation) 등 세가지로 나눌 수 있다.

첫 번째로 소개되는 bioaugmentation 전략은 석탄환경에 석탄분해와 메탄생성에 활성을 가지는 미생물을 주입하는 방법(Ghosh et al., 2014; Davis et al., 2018)이다.

두 번째로 제안된 전략으로는 bioavailability를 증가시키기 위한 석탄의 전처리이다. 석탄의 표면적을 증가시키기 위하여 입경을 작게 분쇄하는 방법(Colosimo et al., 2016), 과산화수소, 과망간산칼륨, 질산, 가성소다 등 산화제를 사용하는 방법(Huang et al., 2013a; Jones et al., 2013) 석탄의 용해도를 증가시키기 위해 생물 계면 활성제 또는 화학 계면활성제를 첨가하는 방법 등이 있다(Colosimo

et al., 2016).

biostimulation은 가장 광범위하게 조사 된 메탄전환의 강화전략으로 영양소첨가를 통한 전략이다. 석탄분해를 촉진시키고 석탄의 메탄 전환을 증가시키는 합성영양물(NH_4^+ , K_2HPO_4 , trace minerals, vitamins)(Jones et al., 2010; Zhang and Liang, 2017)과, yeast extract and/or peptones (Barnhart et al., 2017; Zhang et al., 2016), monosaccharides (Huang et al., 2017), biomass amendments (Barnhart et al., 2017; Davis et al., 2018)등이 생체자극으로 많이 사용된다.

이 외에도 강력한 산화제인 과산화수소를 사용하여 석탄을 전처리하여 메탄 수율을 증가시킨 연구보도도 있다(Jones et al., 2013). 또한 다른 산화제인 과망간산칼륨을 이용한 석탄전처리는 용존유기물과 메탄생성을 증가시키는 것으로 보고 되었다(Huang et al., 2013a, 2013b).

2.2 혐기성 소화조

2.2.1 혐기성 소화조의 개요

혐기성소화는 무산소 상태에서 혐기성 미생물에 의해 유기물을 안정화시키고 분해하여 부산물로 바이오 가스를 생산하는 기술로서 혐기성 전환과정은 hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis등 생화학 반응으로 구성된다(Shin & Song, 1995; De la Rubia et al., 2002; Song et al., 2004). hydrolysis단계에서 지질, 단백질, 탄수화물과 같은 고분자 불용성유기물질이 가용성 지방산, 단당류 및 아미노산으로 분해되며, 이들은 산생성균에 의해 acidogenesis단계에서 휘발성유기산, 알콜, 암모니아, 수소 및 이산화탄소와 같은 유기분자로 발효된다. 그리고 마지막 methanogenesis단계에서 acetoclastic methanogens와 hydrogenotrophic methanogens에 의해 최종 이산화탄소와 메탄으로 전환된다(Lyberatos & Skiadas, 1999; Gutierrez et al., 2009; Mao et al., 2015)(Fig 2.6). 혐기성 소화에서 각 단계에서 반응에 관여하는 미생물은 산발효박테리아와 메탄생성고세균이 지배적이다(Table 2.6).

Table 2.6 Substrates and products for the main anaerobic microbes

Anaerobic bacteria	Substrate	Products
Methanogens	Acetic acid, methanol, CO ₂ , and formic acid	Methane
Hydrolysis bacteria	Complex organic matter	Monomer
Denitrifying bacteria	Oxidized nitrogen	N ₂ , NH ₃ , N ₂ O
Sulfate reducing acteria	Sulfate	H ₂ S
Acetogens	Short chain fatty acids	Acetic acid
Homoacetogens	formic acid, propionic acid compounds	Acetic acid

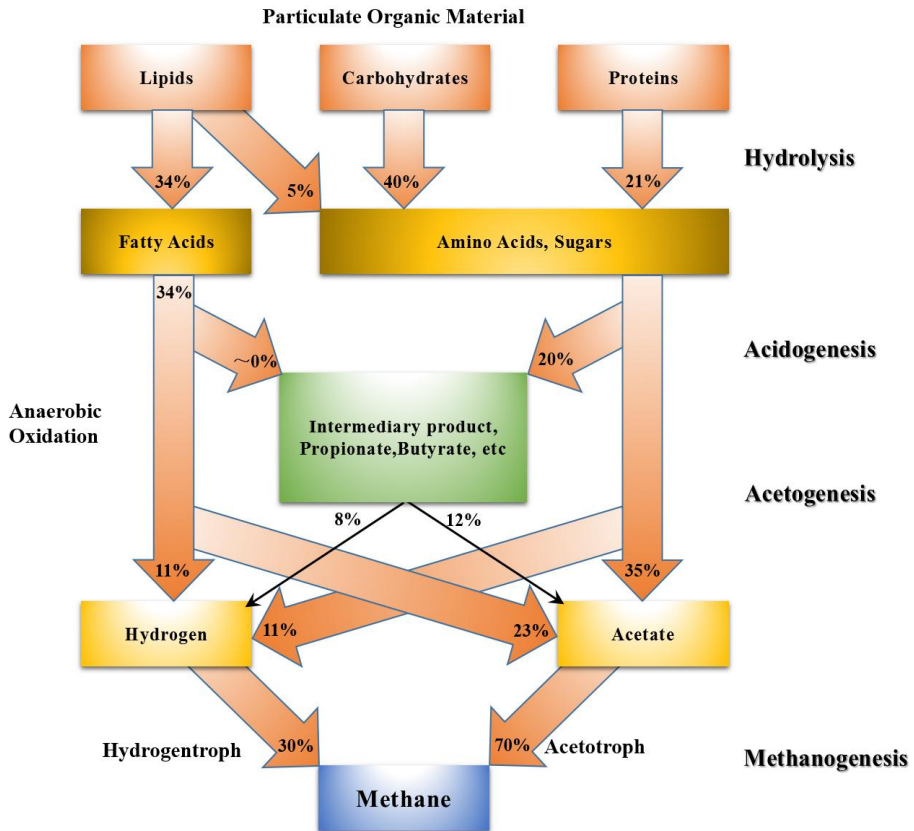


Fig. 2.6. Anaerobic degradation pathway of polymeric biomass to methane (Source: Henze, et al., 1983).

① 가수분해 단계(Hydrolysis)

가수분해 단계는 고분자 유기물질(지질, 단백질, 탄수화물)이 산생성 미생물이 분비하는 체외효소(extracellular enzymes)에 의해 저분자 유기물질인 아미노산, 단당류, 고급지방산(long chain fatty acids, LCFAs) 및 글리세롤과 같은 유기단량체(organic monomer)로 변환되는 과정이며(Toerien and Hattingh, 1969) 지방산, 아미노산, 당류 및 기타 고분자 탄수화물은 박테리아가 쉽게 이용할 수 있는 저분자 유기물로 분해되는 과정이다(Fig. 2.7)(Guerrero et al., 1999; Luo et al., 2012b). 유기물의 혐기성 소화중 산생성 단계에서 가수분해 반응은 혐기성 분해반응의 많은 비중을 차지하는 단계이며, 가수분해 반응이 진행되는 동안 유기물의 안정화는 일어나지 않고 입자성 유기물이 용해성 기질로 전환하는 단계이다. 유기물의 분해를 통해 미생물 성장의 에너지를 생성시키는 단계는 아니지만 혐기성 소화공정의 필수적인 단계이다. Equation 2.4는 가수분해 반응에서 글리코젠이 단당으로 분해되는 것을 보여준다.

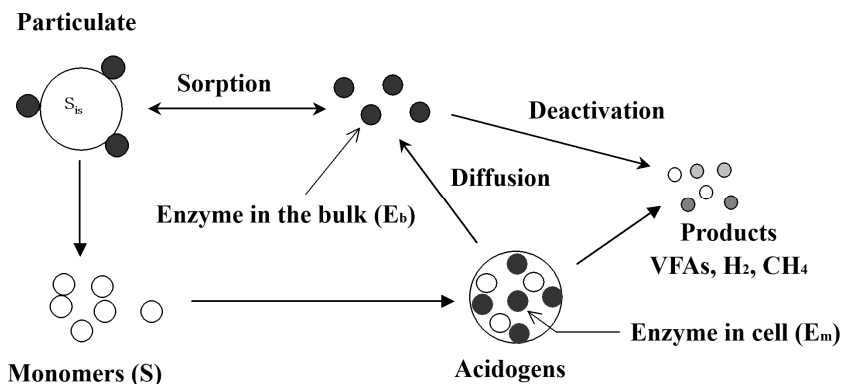
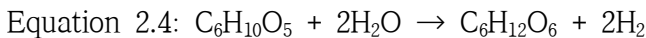
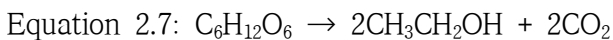
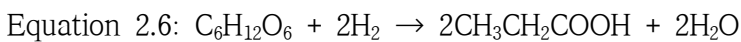
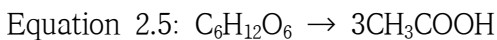


Fig. 2.7. Schematic diagram of hydrolysis model (Source: Feng, 2017).

② 산발효 단계(Acidogenesis)

산발효 단계는 가수분해 단계에서 생성된 단당류, 아미노산, 글리세롤, 고급

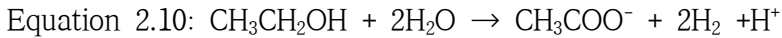
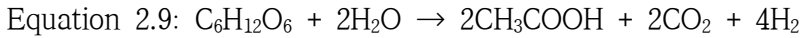
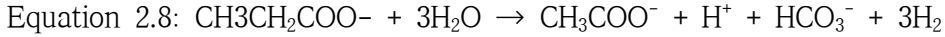
지방산(LCFAs)과 같은 유기 단량체를 *Syntrophomonas wolfei* sp.와 *Syntrobacter wolinii* sp. 와 같은 산생성균에 의해 이산화탄소, 수소, 알콜 및 암모니아 등 유기산을 생성하는 반응이다(Guerrero et al., 1999). 산생성반응은 유기단량체를 이용하여 고급지방산과 알콜 등을 생성하는 산생성단계와 산생성 반응의 생성물을 이용하여 초산을 생성하는 초산생성단계로 세분하기도 한다. 산 발효 단계의 주요 생성물은 ethanol, methanol, formic acid, acetic acid, lactic acid, butyric acid, propionic 등이다. 이들은 acetogenesis단계에서 이산화탄소, 아세트산, 수소등을 생성하고 메탄생성단계에서 메탄발생고세균에 의해 메탄생성에 직접적으로 사용된다. 산생성반응은 수소분압이 낮은 경우, 자유에너지(ΔG°) 값이 감소되므로 외부에너지 공급없이 열역학적인 측면에서 자발적인 반응이 일어난다. 따라서 산생성반응의 생성물들의 비율은 일정하지 않고, 수소분압에 따라 매우 다양하다(Ruzicka, 1996). 정상적인 반응에서는 글루코스 1몰로부터 아세트산이 생성되는 반응은 Equation 2.5과 같으나, 비정상적인 충격조건에서는 과도한 수소의 생성으로 인해 pH와 산화-환원 전위가 저하되어 산생성균은 Equation 2.6 또는 Equation 2.7과 같은 생성반응 경로로 변화되어 혐기성 소화공정의 안정성을 회복한다(Guerrero et al., 1999; Ostrem & Themelis, 2004; Strauber et al., 2012; Zheng et al., 2015)



③ 초산생성 단계(Acetogenesis)

초산생성 단계에서 alcohol, butyric acid 및 propionic acid과 같은 잔류 산발효 생성물들은 acetogenic bacteria에 의해 아세트산, 이산화탄소 및 수소로 전환된다(Fig. 2.6). 그러나 수소는 낮은 분압하에서만 산을 열역학적으로 전환시켜 생성할 수 있기 때문에 수소농도는 혐기성 소화에서 중요한 지표이다(Mata-Alvarez, 2003; Cazier et al., 2015). Equation 2.8-2.10 은 혐기성소화의

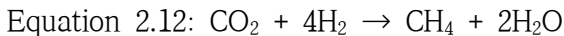
세 번째 단계에서 propionate, glucose 및 ethanol이 아세테이트로 전환되는 것을 나타낸다(Ostrem & Themelis, 2004; Strauber et al., 2012; Zheng et al., 2015).



④ 메탄생성 단계(Methanogenesis)

메탄생성 단계는 혐기성 소화의 마지막 단계로 산생성 단계에서 생성된 저급 지방산과 수소는 Equation 2.11과 Equation 2.12와 같이 메탄생성 단계에서 초산 이용 메탄생성 미생물과 수소 이용 메탄생성 미생물에 의해 최종생성물인 메탄으로 변환된다(Villano et al., 2010). 메탄가스 발생은 초산과 프로피온산으로부터 약 70%가 생성되며, 수소로부터 약 30%가 생성된다(Smith and Mah, 1966; Balch et al., 1979).

메탄생성미생물은 온도, 유기물 부하, 유기물의 종류 등의 환경요인에 매우 민감하여 환경요인이 변화하면 산생성균과 같은 다른 미생물들보다 메탄생성균이 가장 먼저 영향을 받는다. 메탄생성균은 pH 6~8에서 최대성장률을 나타내며, 30~40°C의 중온조건과 약 55°C의 고온조건에서 최대의 활성을 나타낸다(Song et al., 2004; Bolzonella et al., 2005).



2.2.2 혐기성 소화의 영향인자

① 유기물의 성분

혐기성 소화조에 유입되는 유기폐기물은 혐기성 미생물의 영양분이 되는 중요

한 기질이다. 유기물질은 분해되기 쉬운 물질과 분해되기 어려운 물질로 이루어져 모든 물질이 혐기성소화에서 모두 분해되지 않는다(Chen et al., 2008, Cuzin et al. 2001). 분해가 잘 되는 물질은 혐기성 미생물에 의해 생물학적으로 분해가 원활하게 이루어져 높은 처리효율과 다량의 최종 바이오가스를 생산한다. 그러나, 분해되기 어려운 물질들은 혐기성 조건에서 대부분 분해되지 않고 소화조 내에 축적해서 분해를 방해하기도 한다. 따라서, 유입폐기물의 특성에 따라 생물학적으로 분해 가능한 유기물의 양을 기준으로 혐기성 소화조를 운전하여야 한다(Chen et al., 2008. Karakashev et al., 2005)

② 혐기성 소화조의 부하율

유기물의 부하율(Organic loading rate, OLR)은 혐기성소화조의 단위부피당 1일 동안 주입하는 생물학적으로 분해 가능한 유기물의 양이다(Song et al., 2016). 유기물의 부하율이 낮을 경우에는 반응조 내에 자산화가 일어나 바이오가스 생산량이 줄어들고, 부하율이 높을 경우에는 VFAs의 과잉생성으로 VFAs의 축적 및 pH가 감소된다(Zheng et al., 2015; Strauber et al., 2012; Cazier et al., 2015). 혐기성소화조의 부하율은 반응조 내에 독립변수들의 데이터를 통해서 조절이 가능하다(Mata-Alvarez et al., Guerrer2003; o et al., 1999).

③ 수리학적체류시간(HRT)

혐기성소화조의 HRT 하루에 투입하는 유기물의 부피에 의해서 결정되는 것으로서 계절적인 요인에 의해서 영향을 받기도 한다(Luo et al., 2012b). 단상 혐기성 소화공정의 경우 HRT는 20~30일로 설계하는 경우가 많으며(Song et al., 2004), 2상 혐기성소화공정의 경우 1차 혐기성소화조는 20일 이상으로 하며, 2상 혐기성소화조는 10일 이상으로 한다(Song et al., 2004; Lyberatos & Skiadas, 1999; Chen et al., 2008). 혐기성소화조를 가열하지 않고 상온에서 운전하는 경우 HRT는 60~90일이 적절한 것으로 알려지고 있다(Ostrem & Themelis, 2004; Cuzin et al., 2001).

④ pH

혐기성 소화조에서 pH는 혐기성소화조의 운전 및 관리에 중요한 인자중 하나이다(Song et al., 2004; Luo et al., 2012b). 일반적으로 혐기성소화의 최적 pH는 6.5와 8사이이다. 휘발성 지방산의 축적되면 PH가 낮아지고 메탄생성미생물의 활성을 감소시켜 유입되는 유기폐기물의 특성 및 부하량, 온도변화 등의 환경 변화에 대응하는 능력을 감소시킨다(Karakashev et al. 2005). 이때 낮은 pH에서도 활동이 활발한 산생성미생물의 유기산 생성은 계속되지만 유기산을 에너지원으로 이용하는 메탄생성균의 활성 감소로 유기산이 메탄으로 전환되지 못하므로 각종 유기산이 축적되어 pH는 더욱 낮아진다. 중탄산염과 같은 완충성질을 지닌 알칼리도는 휘발성지방산을 중화시켜 메탄생성균이 높은 효율을 유지하는 pH환경을 보완할 수 있다(Shin & Song, 1995).

⑤ 온도

혐기성소화조에서 온도조건은 메탄생성 박테리아의 성장에 중요한 영향을 미치는 요소이다(Song et al., 2004; Varel et al., 1980; Masse et al., 2015). 혐기성소화조의 경우 온도특성에 따라 저온소화법(15~25℃), 중온소화법(38±2℃), 고온소화법(55±2℃)으로 분류된다(Song et al., 2004; Zhang et al., 2009a; Masse et al., 2015; Connaughton et al., 2006). 온도에 따른 유기물 분해속도는 저온·중온소화법에 비하여 고온소화법이 빠르다(Song et al., 2004; Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2006). 일반적으로, 유기물 부하가 낮을 때에는 온도에 대한 영향이 크지 않으나 유기물 부하가 높을 때에는 고온 조건에서 월등한 COD 제거율을 보인다(Ahn and Forster, 2002). 고온소화법의 경우 소화후 슬러지의 함수량이 낮기 때문에 슬러지 처리비용이 줄어들고, 병원균의 사멸이 쉽다는 장점이 있다. 그러나 중온소화법에 비해 가운을 위한 외부에너지 공급량이 많으며, 소화조 운영의 안정성이 낮다는 것이 단점으로 평가된다(Song et al., 2004; Mao et al., 2015; Varel et al., 1980; Guerrero et al., 1999; Zupancic et al., 2003; Labatutu et al., 2014). 따라서 중온 혐기성 소화법은 혐기성 공정의 안정성, 높

은 메탄 수율 및 에너지 요구량 면에서 고려할 때 비교적 합리적이다(Labatut et al., 2014).

⑥ 휘발성지방산(VFA)

휘발성 지방산(VFAs)의 농도는 혐기성 소화의 가장 중요한 인자 중 하나이다(Ahring et al., 1995; Komemoto et al., 2009; Kondaveeti & Min, 2015). 휘발성 지방산의 농도는 혐기성 소화조의 소화상태를 파악할 수 있는 가장 좋은 지표이다. 휘발성 지방산의 농도가 허용농도를 초과하면 메탄생성균의 활성이 저해를 받아 유기산이 분해되는 속도보다 생성속도가 빠르게 진행되어 소화조 내에 축적된다. 휘발성 지방산의 축적은 pH를 감소시켜 혐기성 소화를 저해한다. 즉, 휘발성 지방산의 축적은 여러 단계들 사이의 반응속도 차이에 의한 결과이기 때문에 생물학적 시스템의 불안정한 상태를 의미하는 것이다(Lyberatos & Skadas, 1999; Song et al., 2004).

⑦ 독성물질(Toxic substances)

암모니아, 염분 및 중금속을 포함한 유독 물질은 혐기성 소화의 성능에 영향을 미친다. 일반적으로 암모니아 이온은 혐기성 소화 억제제 및 메탄생성 박테리아에 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Angelidaki et al., 1993). 유입되는 유기 폐기물의 단백질 양은 C/N 비율로 추정할 수 있다. 염의 농도가 높으면 대부분의 미생물이 삼투압에 의해 탈수 되어 성장에 저해를 받는다. 특히, 나트륨 이온은 혐기성 소화에 강한 억제 효과를 나타낸다. 또한 혐기성 미생물은 chromium, cadmium, copper, lead, zinc, nickel 및 cobalt 등의 저해를 받는 것으로 보고되고 있다(Lyberatos & Skiadas, 1999; Mata-Alvarez et al., 2003). 최근 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로 알려지는 micromolecular acids, polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic compounds 그리고 phenols 등의 난분해 물질들은 혐기성 미생물에 독성이 있으며 산발효 및 메탄생성에 저해작용을 한다(Piao et al., 2018; Nzila et al., 2018).

2.2.3 혐기성 소화의 장점

혐기성 소화공정은 호기성공정과 비교할 때, 폐기물의 처리 및 고농도 유기성 폐수 처리에 사용할 수 있으며, 낮은 운전비용과 부산물로 생성되는 바이오가스를 생산하는 에너지 재이용의 장점이 있다. 최근 혐기성 소화기술은 다양한 유기성 산업폐수의 처리에 사용되고 있으며, 친환경적이며 경제적인 기술로 인정받고 있다. 혐기성 공정의 장점은 호기성 공정으로 처리가 어려운 고농도 유기성폐수 또는 난분해성 폐수들을 보다 더 효과적으로 처리할 수 있다는 것이며, 상대적으로 슬러지 발생량이 적고 처리과정에서 발생하는 메탄가스를 대체 연료 에너지로 이용할 수 있기 때문에 경제적인 면에서 유리하다(Ostrem & Themelis, 2004; Zheng et al., 2015). 또한, 혐기성소화공정은 호기성처리 공정에 필수적인 i) 폭기과정이 필요 없고, ii) 잔류 슬러지의 탈수와 건조가 상대적으로 쉽고 iii) 기생충이나 전염병균의 사멸율도 높다는 장점이 있다(Song et al., 2004; Luo et al., 2012b).

그러나, 메탄생성균의 느린 성장속도와 환경변화에 대한 민감성에 기인하여 상대적으로 20일 이상의 i) 긴 HRT가 필요하고 ii) 유기물의 제거율이 낮으며 iii) 운전조건이 예민하다는 단점이 있다. 또한, 혐기성소화조에서 진행되는 iv) 유기물의 분해속도가 매우 느려 혐기성소화 v) 시설이 상대적으로 크고 하수 슬러지의 주요성분인 박테리아는 세포벽은 두껍고 셀룰로스, 리그닌, 실리카 등의 질긴 막으로 구성되어 있어서 vi) 생분해도가 낮기 때문에 VS 제거율도 높지 않다. vii) 소화액의 BOD가 높고 악취가 나며 부대설비의 소요로 투자비가 크고 수질, 수질의 변동에 큰 영향을 받는다는 단점이 있다(Song et al., 2004; Chen et al., 2008; Song et al., 2016).

2.3 생물전기화학 혐기성 소화

2.3.1 생물전기화학 혐기성 소화의 작동 원리

생물전기화학은 미생물의 촉매작용을 이용하여 유기물에 함유된 화학에너지를 전기에너지 또는 수소, 메탄 등의 유용물질로 전환시키는 장치이며, 산화전극(Anode), 환원전극(Cathode), 분리막 그리고 산화전극과 환원전극을 연결하는 외부회로인 도선으로 구성된다. 생물전기화학 혐기성소화는 혐기성소화조에 전극을 설치하여 일정한 전압을 인가하는 생물전기화학 혐기성소화공정 기술(Bioelectrochemical Anaerobic Digestions, BEADs)로서 외부전원을 이용해서 산화전극의 전위를 높이거나 환원전극의 전위를 감소시켜 전극표면에서 진행되는 산화반응 및 환원반응을 촉진시키는 방법이다. 생물전기화학 혐기성소화조의 산화전극 표면에서 부착성장하는 전기적으로 활성을 가진 미생물은 유기물을 분해하여 생성되는 전자를 산화전극으로 전달하며, 양성자는 산화전극이 잠겨 있는 액상으로 방출한다. 이때 산화전극과 환원전극에 일정한 전위차를 유지시키면 환원전극에서는 양성자와 수소이온이 결합하여 수소나 메탄가스를 발생시킨다(Fig. 2.8)(Wang et al., 2009). 양극과 음극 표면의 반응은 각각 Equation 2.10과 Equation 2.11에 의해 설명된다 (Song et al., 2016; Cheng et al., 2009).

Equation 2.10: $\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CO}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^-$, $E_{\text{pa}} = -0.486\text{V}$ (vs. Ag/AgCl)

Equation 2.11: $\text{CO}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$, $E_{\text{pc}} = -0.445\text{V}$ (vs. Ag/AgCl)

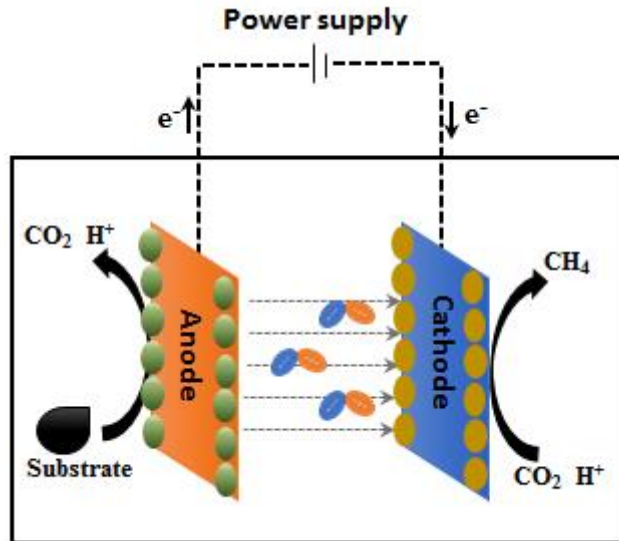


Fig. 2.8. Schematics of bioelectrochemical anaerobic digestion.

2.3.2 생물전기화학 혐기성 소화의 영향인자

① 전극(Electrode)

생물전기화학전지에서 효율적인 산화전극이 갖추어야할 조건은 i) 높은 생물 친화도, ii) 미생물이 부착성장 할 수 있는 넓은 표면적, iii) 높은 전기전도도, iv) 전극의 형태를 쉽게 제작할 수 있는 제조성, v) 생물학적 및 화학적으로 안정하는 내구성, vi) 저렴한 재료들이 있다(Liang et al. 2011; Song et al., 2015a). 생물전기화학전지의 환원전극은 전자수용체로서 산화전극으로부터 전달되어온 전자와 산화전극에서 생성된 이산화탄소나 수소이온과 만나서 수소나 메탄을 생성하는 반응이 진행된다. 이때 환원전극의 촉매는 반응속도를 촉진시킨다. 따라서 효율적인 환원전극반응을 위해서는 전자와 양성자 또는 이산화탄소가 바이오가스 생성을 촉진시키는 촉매가 위치한 반응지점에 동시에 공급되어야 한다. 환원전극이 원활하게 진행되도록 전자를 반응지점까지 공급하기 위해서는 고전도성의 재료를 사용하여야 한다. 그리고 환원전극은 환원반응이 효율적으로 진행되도록 넓은 비표면적을 제공하여야 하며 내구성이 있어야 한다.

대부분의 탄소기반 물질들은 대체적으로 위의 요건을 만족시키는 환원전극재료이다. carbon paper, carbon plate, carbon cloth, graphite rod graphite granule, reticulated vitrified carbon(RCV), carbon nano tube(CNT) 등의 물질들이 환원전극재료로 널리 사용되어왔다(Table 2.7) (Song et al., 2015ab; Feng & Song, 2016a,b).

Table 2.7 Status of bioelectrochemical anaerobic digestion according to few representative studies

Substrate	Volume	Electrode materials	Voltage	Methane Production	Reference
Activated sludge	0.8 L	Reticulated vitreous carbon	0.3~0.6v	1.65 ml/L	Gajaraj et al., 2017
Artificial wastewater	0.49 L	Carbon-felt	Cathode potential: -0.85-1.15 V (vs. Ag/AgCl)	0.27 L.d	Jiang et al., 2013
Synthetic wastewater	1 L	Graphite	1.0-1.5 V	1.2 L/L.d	Li et al., 2016
Artificial wastewater	0.3 L	Ti/Ru alloy mesh plate	1.4~1.8V	0.43-0.53 L/L	Guo, et al., 2013
Sewage sludge	4.0 L	Carbon fiber fabric	Cathode potetnial: 0.8 V (vs. Ag/AgCl)	2.35 L/L.d	Sasaki et al., 2013
F-T wastewater	4.8 L	Graphite felt (GF)	1.5 V	2.31 L/L.d	Wang et al., 2017
Glucose & acetate	1 L	Graphite	0.5-1.0 V	0.94-0.99 L/L.d	Zhao et al., 2014

② 인가전압(Applied voltage)

생물전기화학전지에서 산화전극과 환원전극 사이에 일정한 전위차는 효율적인 운전을 위해 필요한 가장 중요한 인자 중의 하나이다. 생물전기화학전지의 산화전극에 부착성장하는 전기적 활성을 가진 미생물은 전자공여체로서 유기물을 분해하여 전자는 산화전극에 양성자는 환원전극에 공급한다. 환원전극으로 이동한 양성자는 수소이온과 결합해서 수소가스 및 이산화탄소와 결합하여 메탄

을 생성한다(Liang et al., 2011; Liu et al., 2012). 따라서 산화전극과 환원전극 간의 전자기동은 외부전원으로부터 인가한 전압의 크기 및 전극의 내부저항 별 크슬루션의 영향을 받을 수 있다(Rader & Logan, 2010; Nam et al., 2011). 전극간의 전위차가 낮으면 생물전기화학 반응은 일어나지 않으며, 전위차가 너무 클 경우에는 물의 전기분해가 일어날 수 있다. Wang의 연구결과에 의하면 0.5~0.9V의 전위차를 인가하였을 때 수소가스 발생량이 가장 높았으며, 0.3~0.4V의 전위차를 인가하였을 때는 메탄가스 발생량이 높았다. 또한, 메탄생성반응이 일어나기 위한 환원전극의 이론적인 최소 전위는 $-0.21V$ (vs. SHE)이다 (Wang et al., 2009).

③ 기타(Others)

최근에, 미생물 연료 전지 (MFCs) 및 미생물 전해 전지 (MECs)와 같은 생물전기화학시스템이 유입수의 pH 및 온도와 같은 외부 환경 조건에 덜 민감하다는 것이 입증되었다(Larrosa-Guerrero 외, 2010; Heidrich et al., 2014). 이전 연구에서 생물 전기 화학 반응기에서 pH 7.0에서보다 pH 5.8에서 바이오 가스 생산 속도는 30 % 증가했다 (Hu et al., 2008). 10 °C에서의 생물전기화학 혐기성 소화조의 메탄 수율은 10 °C에서 작동하는 대조구(인가 전압 및 전극 없음)보다 5.3 ~ 6.6 배 높았으며, 중온 조건 (35 °C)에서 작동하는 대조구의 수율과 동일하였다(Liu, et al., 2016). 하여 생물전기화학 혐기성 소화조가 외부 환경에 영향을받지 않는다는 것을 단순히 정의하는 것은 어렵다. 생물전기화학 혐기성 소화조의 성능은 유기물, 유기물 부하율, HRT, pH, 온도 등과 같은 유입 특성에 영향을 기존의 혐기성 소화조만큼 크지 않으며 전극 표면에 부착 된 전기 활성 박테리아는 외부 환경에 의해 영향을 받을 수 있다(Feng, 2017).

제 3 장 석탄의 생물학적 메탄전환의 생물전기화학적 증진

3.1 서론

석탄층메탄(Coal-bed methane: CBM)은 지하 석탄층에서 형성되는 천연가스의 중요한 에너지원이다. CBM은 일반적으로 석탄층에 설치한 추출정을 통하여 생산하지만 추출속도는 석탄층에서 생성되는 CBM의 속도에 의해 제한된다(Colosimo et al., 2016; Wang et al., 2017; Davis et al., 2018). CBMs은 석탄에 함유된 유기물질로부터 전환되는 열화학적인 생성방법과 생물학적 생성방법의 두가지 경로가 있다(Davis et al., 2018). CBM의 열화학적 생성은 높은 온도와 압력에서 석탄화의 부산물로 형성되지만, CBM의 생물학적 생성은 석탄에 함유된 유기물질이 혐기성 미생물에 의하여 일련의 분해반응과 메탄전환반응이 수행되는 연속적인 과정이다. 그러나, 석탄의 생물학적 메탄전환율은 매우 낮으며, 메탄생성속도도 너무 느려서 경제적이지 못하다(Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017). 때문에 CBM를 상업적으로 이용하기 위해서는 석탄의 메탄전환속도와 메탄 수율을 향상시키는 것이 필수적이다.

유기물의 혐기성분해과정을 살펴보면 고분자유기물은 가수분해되어 단당류로 전환되고 단당류들은 산생성균들에 의해 초산과 수소와 같은 중간생성물로 발효된 뒤 메탄생성균에 의해 초산과 수소가 메탄으로 전환된다(Shin and Song, 1995; Song et al., 2016). 유기물의 혐기성분해반응에 영향을 미치는 가장 중요한 인자는 유기물의 물리화학적인 특성이다. 석탄에 함유된 유기물성분은 탄화가 진행 중인 리그닌과 같은 소수성 고형물질들로서 가수분해 반응이 매우 느리게 진행된다. 가수분해 생성물은 long chain fatty acids, alkanes (C19-C36), various aromatic hydrocarbons를 포함하는 까다로운 순환 화합물로 구성되어 있으며 산발효가 어렵다(Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017; Nzila, 2018). 방향족 화합물들은 일반적으로 방향족고리(aromatic ring)를 산화시키거나 방향족의 핵(aromatic nucleus)에 분자상태의 산소를 첨가하여 ring을 opening함으로써 호기성 조건하에서 분해될 수 있다(Nzila, 2018; Sharma et al., 2016). 분자상태

의 산소가 존재하지 않을 때 전자수용체로 ring opening을 위하여 질산염, 철, 황산염 등이 사용될 수 있다(Nzila, 2018). 그러나, 이러한 외부전자수용체들이 존재하지 않는 낮은 산화환원전위 상태에서는 이산화탄소를 환원시켜 메탄을 생성할 수 있지만 열역학적으로 불리하다.

지금까지 석탄의 생물학적인 메탄전환반응을 촉진시키기 위하여 석탄의 bioavailability 증가, biostimulation, bioaugmentation 등의 방법들이 시도되어 왔다. 석탄을 분쇄하여 입경을 감소시키거나, 공극율의 향상, 계면활성제 주입 등의 방법은 석탄의 bioavailability를 향상시키기 위한 시도들이다.(Zhang et al., 2016; Fuertez et al., 2017; Jones et al., 2010; Ghosh et al., 2014). Bioaugmentation와 biostimulation의 방법은 미생물 컨소시엄 또는 질소, 인, 미량 원소 및 비타민과 같은 무기질 영양분이 석탄층에 공급되어 메탄으로의 석탄 전환을 촉진 시키는데 효과적으로 사용되었다. (Wang et al., 2017; Davis et al., 2018;). 그러나 석탄의 생물학적인 메탄전환반응을 촉진시키기 위한 여러 가지 노력들에도 불구하고 아직까지 석탄 1 그램에서 혐기성미생물에 의해 생산 가능한 메탄 수율은 수십 마이크로리터에서 수 밀리리터에 불과하였다 (Wang et al., 2017; Zheng et al., 2017; Fuertez et al., 2017; Bao et al., 2016). 석탄의 유기물함량을 나타내는 COD(chemical oxygen demand)는 석탄의 탄화 정도와 매장위치에 따라 다르지만 갈탄의 경우 석탄 그램당 0.5-0.8 그램 정도로서 비교적 높다. 유기물의 혐기성분해반응을 통하여 생산할 수 있는 이론적인 메탄의 수율은 350 mL/g COD 이다. 이것은 향상시킬 수 있는 석탄의 바이오메탄의 잠재성은 대단히 높다는 것을 나타낸다.

전극 표면에서 일어나는 산화환원반응의 열역학적인 자유에너지 변화량은 전기적인 분극에 의해 달라진다. 생물전기화학 혐기성소화에서는 이러한 전기화학 원리를 유기물의 혐기성분해반응을 개선하기 위하여 이용한다(Song et al., 2016; Feng et al 2018). 생물전기화학 혐기성 소화조는 기존의 혐기성 소화조에 분극 된 적극쌍을 설치하는 것이다. 생물전기화학 혐기성 소화조에서 산화/환원 전극 표면에는 각각 exoelectrogenic fermentation bacteria(EFB)와 electrorophic methanogenic archaea(EMA)의 전기 활성 미생물이 성장하여 enrich 된다(Feng et al., 2018a; Doyle and Marsili, 2015; Zhao et al., 2016). 이

들 전기 활성 미생물은 cytochrome C를 세포외벽까지 확장시켜 전자를 외부로 직접전달하거나 외부에서 전자를 직접받는 균이다(Song et al., 2016; Feng et al., 2018a). EMA는 EFB로부터 전자를 직접 받아 이산화탄소를 환원시킴으로서 메탄을 생성하는 미생물이다(Feng et al., 2018b; Doyle and Marsili, 2015). 최근 EFB와 EMA들은 분극 전극 표면 뿐만 아니라 분극 전극들 사이의 벌크용액에서도 enrich 하는 것으로 밝혀지고 있다(Feng et al., 2018a; Feng et al., 2018b). 산화 환원 반응의 전자전달은 전극이나 전도성 물질 또는 직접접촉에 의하여 EFB와 EMA의 종간에서 직접 전달 될수 있다.(Feng et al., 2018b; Rotaru et al., 2014; Shrestha and Rotaru 2014). 혐기성분해반응의 동력학적 및 열역학적인 한계는 생물전기화학 혐기성 소화조에서 종간직접전자전달(DIET)을 통한 메탄생성에 의해 상당히 완화될 수 있다 (Feng et al., 2018b; Song et al., 2004). 이는 생물전기화학적 접근 방법은 석탄의 메탄전환 반응을 향상시킬 큰 잠재력을 가지고 있음을 시사한다. 그러나 아직까지 종간직접전자전달을 이용한 생물전기화학적 석탄의 메탄전환반응은 전혀 연구되지 않았다.

본 연구에서는 우선 분극 된 절연전극이 생물전기화학 혐기성 소화조에서 갈탄의 메탄전환율을 현저히 향상 시킨다는 것을 보여주었다. 또한 석탄의 메탄전환반응을 제한하는 율속단계를 추정하였고 메탄전환반응에 대한 가수분해 및 산발효 중간생성물들의 저해효과도 평가하였다.

3.2 재료 및 방법

3.2.1 석탄 및 식종 슬러지

실험을 위하여 상업적으로 이용 가능한 캐나다산 갈탄(Aquajiny Co., Daegu, Korea)을 준비하였다. 이 갈탄의 주요특성은 VS/TS(휘발성고형물질과 총고형물질의 비율)은 28.5%, COD는 0.52,g/g lignite, 함수율은 18.4%이었다. 준비된 갈탄은 막자사발을 이용하여 분쇄하고 1mm 체로 걸러 분말형태로 만들었으며, 105℃에서 12시간 건조시켜 메탄전환 실험에 사용할 갈탄 시료를 준비하였다. 혐기성 회분식실험을 위한 배지는 초기농도가 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.45 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.58 g/L, NH_4Cl 0.31 g/L 그리고 KCl 0.13 g/L가 되도록 준비하

였으며, 소량의 vitamins and trace metals 용액을 이전의 방법에 따라 추가하였다(Feng et al., 2016). 하수 처리장(Sewage Treatment Palnt of Busan, South Korea)에서 수집한 혐기성소화슬러지를 1 mm 체로 거른 후 4°C 냉장고에서 24 시간 동안 침전시킨 후 혐기성회분식실험과 혐기성독성실험을 위한 식종균으로 사용하였다. 혐기성회분식실험에서 사용한 혐기성 슬러지의 초기 특성은 pH 7.17이었으며, 알칼리도와 VSS가 각각 2114 mg/L as CaCO₃, 13.4 g/L 이었다. 혐기성독성실험에 사용한 혐기성 슬러지의 초기 pH는 7.25 이었으며 알칼리도와 VSS가 각각 3702 mg/L as CaCO₃, 16.1 g/L 이었다.

3.2.2 실험장치

Cylindrical acrylic resin tube를 이용하여 bioelectrochemical anaerobic batch reactor (2세트, 유효부피 0.5L, 직경 8.5 cm, 높이 10 cm)를 제작하였다 (Fig. 3. 1). 혐기성 회분식 소화조의 상부는 acrylic plate로 이루어진 cover를 flange joint하여 sealing함으로서 혐기성상태를 유지할 수 있도록 밀봉하였다. 소화조 내부에는 교반을 위한 blade를 설치하였다. 블레이드는 steel shaft를 이용하여 반응조 상부에 설치된 DC motor에 연결하였다. Acrylic cover에는 액체 및 가스 sampling ports 그리고 off-gas valve를 설치하였다. 시료 채취구와 가스채취구는 n-butyl bubber stopper로 각각 밀봉하였다. 액체시료 채취구 및 블레이드 축이 통과하는 상부덮개의 하단에는 외부공기의 유출입을 차단하기 위하여 액상에 잠기도록 연장된 sealing tube를 각각 부착하였다. off-gas valve는 고무관으로 부유식 가스수집기(floating type gas collector)와 연결하였다. 부유식 가스수집기의 내부에는 미생물의 번식과 발생한 가스의 재용해를 막기 위하여 황산과 NaCl로 산성화된 포화염수를 채웠다. 대면적(26 cm × 9 cm)과 소면적(5.5 cm × 7 cm)의 구리호일(0.3 T, copper 99.9%, KDI Co., Seoul, Korea)을 각각 준비한 뒤 표면을 유전물질(alkydenamel, VOC 470 g/L, Noroo paint Co., Busan, Korea)을 이용하여 코팅하였다. 코팅된 대면적 및 소면적 구리호일은 반응조 내벽과 블레이드 축 밀봉관의 외벽에 각각 환형으로 설치하였다. 내부 및 외부 전극 사이의 간격은 3.3 cm이었다. 전극들은 티타늄선과 접속시킨 뒤 외

부직류전원(ODA Technologies, CO., Incheon, Korea)의 단자에 각각 연결하였다. 실험을 위하여 각각의 혐기성 회분식 소화조에 식종균 250 mL과 배지 250 mL을 주입한 뒤 석탄의 초기 농도가 5 g/L가 되도록 갈탄 2.5g을 주입하였다.

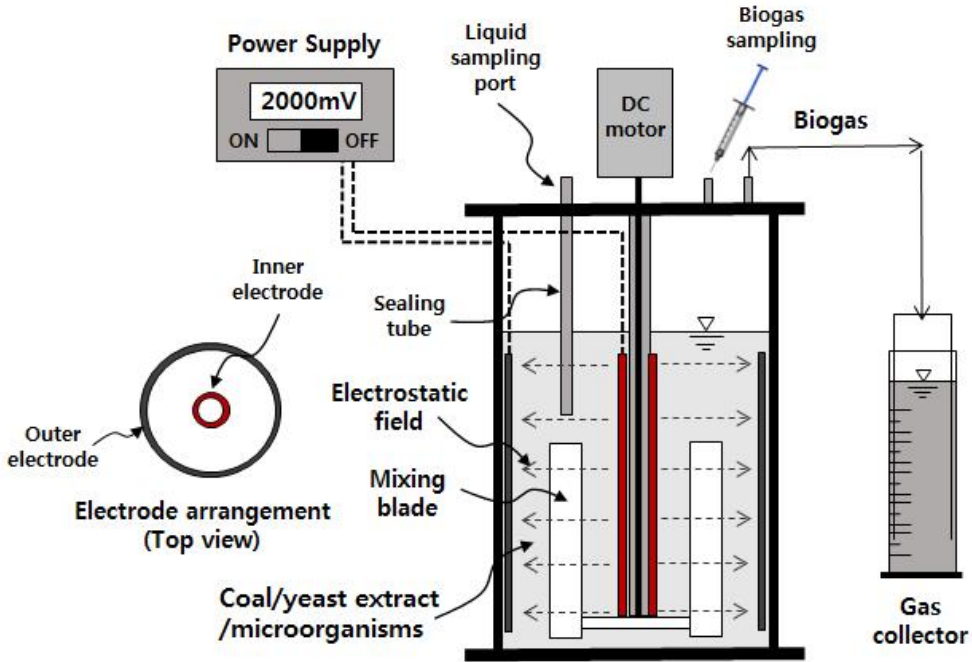


Fig. 3.1. Schematic diagram of the bioelectrochemical anaerobic batch reactor.

전극은 외부 직류전원을 이용하여 1 V 및 2 V의 전압을 전극 사이에 각각 인가하여 분극화하였다. 1 V의 전압을 인가한 회분식 소화조는 BEF1, 2 V의 전압을 인가한 회분식 소화조는 BEF2로 명명하였다. 준비된 소화조는 35°C의 항온실에 설치하였으며 DC 모터를 이용하여 블레이드를 약 120 rpm으로 회전시켜 교반하였다. 또한, 전압을 인가하지 않은 반응조를 별도로 준비하여 대조구로 사용하였으며, 접중원에서 발생한 메탄발생량을 보정하기 위하여 석탄을 주입하지 않은 반응조를 동일한 조건에서 운전하였다.

3.2.3 혐기성 독성실험

생물전기화학 혐기성 회분식 실험 종료 후에 액상에 잔류하는 유기물의 독성을 평가하기 위하여 갈탄의 가수 분해 생성물을 수집하였다. 가수분해 및 산발효 중간생성물의 COD 및 PH는 4.16 g/L 및 8.25였다. 가수분해 및 산발효 중간생성물의 혐기성 독성 실험을 위하여 준비 한 125 mL의 혈청병에 식중슬러지(40 mL)와 중간생성물 용액(8~32 mL), 혐기성 배지(8~32 mL)를 주입하여 총 80 mL 되도록 하였다. 또한, 쉽게 분해가능한 기질로서 포도당을 0.2g(농도: 2.5 g/L) 주입하였다. 준비된 혈청병은 질소가스로 flushing 한 뒤 clump를 이용하여 고무마개와 알루미늄 캡으로 밀봉하였다. 밀봉된 혈청병은 35°C로 온도가 제어되는 로타리셰이크에서 120 rpm으로 연속 교반하며 배양하였다. 또한, 혈청병에 잔류유기물 시료용액을 첨가하지 않고 배지용액 40 mL와 포도당 만을 주입한 혈청병을 별도로 준비하여 대조구로 사용하였다. 접종물에서 발생한 메탄발생량을 보정하기 위하여 Glucose를 주입하지 않은 혈청병을 대조구와 동일한 조건에서 운전하였다. 모든 혈청병에서의 혐기성 독성 실험은 triplicates 로 수행하였다.

3.2.4 분석 및 결과 해석

생물전기화학 혐기성 회분식 실험이 진행되는 동안 액체시료 채취구를 통하여 소량의 수집한 뒤 TS, VS, TCOD, SCOD, VSS 등의 물리화학적 특성변화를 모니터링하기 위하여 Standard Method에 따라 분석하였다. pH는 pH측정기(YSI pH1200 laboratory pH meter 115-230V(T1))을 이용하여 측정하였다. 또한, 생물전기화학 혐기성 회분식 반응조가 안정화되었을 때 시료를 채취하여 UV 검출기와 Amines HPX-87H 분리컬럼이 장착된 HPLC (high-performance liquid chromatography, UltiMate 3000, Thermo Scientific, Sunnyvale, USA)를 이용하여 분석하였다. 생물전기화학 혐기성 회분식 반응조에서 발생한 바이오가스의 조성(메탄, 수소 및 이산화탄소)은 Porapak-Q 컬럼(6ft × 1/8 “, SS)과 TCD(열전도 검출기)가 장착된 GC(Gas Chromatograph Clarus 580, PerkinElmer Co., Ltd.)를 이용하여 분석하였다. 생물전기화학 혐기성 회분식 반응조의 메탄과 수소의 누적생성량은 식 3.1을 이용하여 부유식 가스수집기에서 관측된 바이오가스발생

량과 바이오가스의 조성으로부터 계산하였다.

$$\text{Equation 3.1: } V_{\text{CH}_4/\text{H}_2} = C_{\text{CH}_4/\text{H}_2} \times (V_{\text{RH}} + V_{\text{GT}} + V_{\text{GC}})$$

여기서, $V_{\text{CH}_4/\text{H}_2}$ 는 메탄 또는 수소의 누적 생산량(mL)이며, $C_{\text{CH}_4/\text{H}_2}$ 는 모니터링한 바이오 가스에서 메탄 또는 수소의 함량이다. V_{RH} 는 회분식 소화조의 헤드 스페이스 부피이며, V_{GT} 는 소화조와 가스 수집기 사이의 고무 튜브의 부피, V_{GC} 는 가스 수집기의 가스부분 부피이다. 메탄과 수소 생산량은 이전 연구에 따라 표준 온도와 압력(STP)에서 상응하는 값으로 전환시켰다(Feng et al., 2018a; Feng et al., 2016). 회분식반응조의 실험의 종료직전 벌크용액에 대하여 cyclic voltammetry(CV)실험을 수행하였다. CV 실험에서 작업전극과 대조전극은 각각 작은 스텐망 조각(1cm×1cm)을 이용하였으며, Ag/AgCl 전극을 기준전극으로 사용하였다. CV 실험은 정전위장치(ZIVE SP1, WonA Tech, Korea)을 이용하여 -1.0 V에서 1.0 V 까지 10mV/sec 속도로 스캔하는 방법으로 진행하였다. Smart manager software (ZIVE BP2 Series, WonATech, Kore)를 사용하여 cyclic voltammogram으로부터 redox 피크전위와 전류를 구하였다.

혐기성 독성 실험에서는 혈청병의 배양 전후에 액체시료의 COD, VSS, pH, 알카리도와 같은 물리화학적 특성을 혐기성회분식 실험에서와 동일한 방법으로 분석하였다. 혈청병에서의 바이오가스발생량은 운할 유리 주사기를 이용하여 간헐적으로 모니터링하였다. 혈청병으로부터 모니터링 시간간격동안 발생한 메탄생성량은 바이오가스발생량과 바이오가스의 메탄 함량으로부터 다음 식 3.2를 이용하여 계산하였다.

$$\text{Equation 3.2: } V_{\text{CH}_4,t} = C_{\text{CH}_4,t}(V_{\text{G},t} + V_{\text{R}}) - V_{\text{R}}C_{\text{CH}_4,(t-1)}$$

여기서, $V_{\text{CH}_4,t}$ 는 (t) 시점의 메탄발생량(mL)이며, $V_{\text{G},t}$ 는 (t) 시점에서 발생한 바이오가스의 총 부피이고, $C_{\text{CH}_4,t}$, $C_{\text{CH}_4,t-1}$ 는 (t)시점 및 (t-1)시점에서 모니터링한 메탄의 함량이다. V_{R} 는 혈청병의 헤드 스페이스의 부피이다. 메탄생성량은 생물전기화학 혐기성 회분식 실험에서와 같이 여 STP 상태로 전환했다.

혐기성독성실험에서 발생한 누적메탄발생량은 다음 식3.3의 Modified Gompertz 방적식에 R의 nlstool package를 이용하여 곡선적합시켜 지체기와 최대메탄생성 속도 그리고 최종메탄발생량을 계산하였다.

$$\text{Equation 3.3: } P = P_u \times \exp[-\exp(\mu m \times \exp(1) \times (\lambda - t) / P_u + 1)]$$

여기서, P는 시간 t에서의 누적메탄발생량(mL)이며, P_u는 최종메탄발생량(mL)이다. μm은 최대메탄발생속도(mL/d)이며, λ는 지체기(d)이다.

3.3 결과 및 고찰

3.3.1 정전기장에서 석탄의 생물전기화학적 메탄전환

생물전기화학 혐기성회분식반응조에 설치된 전극에 1V를 인가한 BEF1에서 누적메탄발생량은 22일까지 매우 작았으나 24일째 35.2 mL/g coal로 급격하게 증가하였다. 이후 수일동안 누적메탄발생량은 다소 감소하는 경향을 보였으나 29일부터 다시 급격히 증가하여 31일에 54.5 mL/g coal 까지 증가하였다 (Fig. 3.2). 이 값은 우리가 아는 한 지금까지 보고된 최고의 석탄의 바이오 메탄 수율 값이다. 지금까지 석탄의 바이오 메탄 수율은 석탄의 종류와 탄화된 정도에 따라 다르지만 lignite의 경우 최대가 7.4 mL/g coal 정도로 매우 낮았다 (Davis et al., 2018; Zheng et al., 2017). 석탄의 바이오메탄 수율이 낮은 것은 석탄의 유기물성분이 리그닌 등과 같이 생분해도가 낮은 난분해성 복잡물질들로서 혐기성미생물이 대사하기에 좋은 기질이 아니기 때문이다(Wang et al., 2017). 따라서, 이전 연구에서는 메탄전환율을 향상시키기 위하여 Yeast, algae 및 cyanobacteria과 같은 영양물질을 주입하여 석탄의 혐기성대사를 촉진함으로써 메탄 수율을 1.66-2.93mL/g coal 까지 증가시킬 수 있었다(Davis et al., 2018). 또한, 석탄의 생물학적 이용 가능성을 개선시킨 호기성 전처리방법은 메탄 수율을 4.98 mL/g coal까지 향상시킬 수 있었다(Wang et al., 2017). 그러나, 1.0 V의 전압을 인가한 BEF1에서 생물전기화학인 방법에 의해 향상된 바이오 메탄 수율은 이전의 연구결과들보다 10.9-32.8배 가량높은 값이다(Wang et al., 2017; Davis et al., 2018). 흥미롭게도 BEF1에서 메탄과 수소 발생량의 불연속적인 변

화가 관측되었다(Fig. 3.3). 혐기성소화조에서 메탄생성의 주요경로는 산발효에 의해 초산 및 수소가 생성되고 초산이용메탄균 및 수소이용메탄균이 각각 초산과 수소를 이용하여 메탄을 생성하는 것이다(Shin et al., 1995; Wang and Liu, 2018). BEF1의 운전 중에는 바이오가스에서도 수소가 관찰되었다. 바이오가스에서 수소의 양은 반복적으로 증가하고 감소했다. 그러나 BEF1의 메탄생성은 수소의 감소와 동일한 거동을 나타내지 않았으며 수소의 소비량과 메탄의 생성량의 상관관계는 매우 낮았다(Fig. 3.3). 이는 BEF1에서 석탄의 메탄 전환 메커니즘이 알려진 중간 수소 이동과 다를수 있음을 의미한다. homoacetogens은 생물전기화학 혐기성 소화조에서 이산화탄소를 수소로 산화시켜 exoelectrogens의 기질인 초산을 생산하는 것으로 밝혀졌다(Moestra et al., 2015; Kadier et al., 2018; Wang et al., 2018). BEF1에서 산발효균이 석탄의 가수분해 산물을 발효시켜 수소를 생성하고 homoacetogens가 수소화 이산화탄소를 이용하여 초산을 생산한 것으로 보인다. 생물전기화학적 혐기성 소화조에서는 전극표면 또는 벌크용액에 존재하는 exoelectrogens가 저분자유기물을 발효시키고 전자를 electrorophic methanogens로 직접전달하여 메탄생성반응을 촉진하는 것으로 알려지고 있다(Song et al., 2016; Feng et al., 2018a; Feng et al., 2017). 회분식 실험종료 직전 BEF1의 벌크용액에서 측정된 CV에서는 $-0.014/-0.239V$ vs. $Ag/AgCl$ ($E_f = -0.127 V$) 및 $0.913/0.025V$ vs. $Ag/AgCl$ ($E_f = 0.461 V$)에서 각각 산화/환원 피크쌍이 관찰되었다(Fig. 3.4). CV의 산화/환원 피크는 전기활성미생물 또는 전자전달매개체와 같은 전기활성물질의 존재를 나타낸다(Feng et al., 2018a). 혐기성소화조에서는 표준상태에서 산화환원전위가 $-0.44V$ vs. $Ag/AgCl$ 이하일 때 열역학적으로 이산화탄소가 환원되어 메탄이 생성된다. 따라서 2번째 redox 피크는 석탄의 메탄전환반응에 관여하지 않을 가능성이 있는 물질이다. 생물전기화학 혐기성반응조에서 redox 피크 전위의 형식전위(E_f)는 전기활성미생물이나 전자전달매개체의 종류에 따라 -0.23 vs. SHE $\sim 0.7V$ vs. SHE의 범위에서 다양하게 나타난다(Lim et al., 2017). BEF1에서 전극 사이의 인가된 전압은 $1.0V$ 이고 벌크 용액의 전기장은 이론적으로 $0.3V/cm$ 이다. 이것은 BEF1의 첫 번째 피크가 메탄생성반응에 직접 관여할 수 있는 효과적인 전기 활성 물질임을 나타낸다. BEF1의 메탄은 exoelectrogens과 electrorophic

methanogens 또는 acetoclastic methanogens 사이의 syntrophic metabolisms에 의해 아세테이트에서 생성된 것으로 보인다.

전압 2V를 인가한 BEF2에서는 BEF1과는 달리 15일부터 메탄발생의 급격한 증가가 관측되었으며, 19일째 누적메탄발생량은 46.7 mL/g coal로서 최대값을 보였다. (Fig. 3.2). BEF2에서의 수소 생성은 15일째에만 관찰되었다(Fig. 3.3). 수소 소비량과 메탄 생산량 사이의 상관관계는 BEF1과 유사했다. 이것은 BEF2에서도 수소의 소모와 메탄발생의 상관관계는 낮으며 수소이용메탄균에 의한 메탄전환의 가능성 또한 낮다는 것을 나타낸다.

BEF2의 벌크용액에 대한 CV의 산화/환원 피크전위는 0.055/−0.286 V vs. Ag/AgCl ($E_f = -0.116$ V)와 0.986/0.135 V vs. Ag/AgCl ($E_f = +0.561$ V)에서 관측되었다. BEF2에서 첫 번째 피크의 형식전위는 BEF1에서보다 양의 방향으로 약간 이동한 값이지만 메탄생성을 위한 전자전달에 기여하였을 가능성이 높다. 이것은 BEF2에서도 exoelectrogens와 electrotrophs 사이의 중간직접전자전달(DIET)이 잠재적으로 석탄가수분해 물질의 발효와 메탄생산에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

흥미롭게도 BEF1 및 BEF2 에서 모두 누적메탄발생량은 급격한 증가 이후 점차적으로 감소하는 현상이 뚜렷이 관측되었다 (Fig. 3.2). 이것은 Methanotrophs에 의해 메탄이 소비된 것으로 보인다. 일반적으로 Methanotrophs는 호기성 조건에서 메탄을 대사하고 alkanes, aromatics 및 halogenated alkenes을 산화시키는 독특한 능력을 가지고 있다(Murell and Radajewski, 2000; pandey et al., 2014; Wang et al., 2015).

이전 연구에서 생물전기화학반응조에서 Methanotrophs는 산화전극을 전자수용체로 사용하여 산화하였다 (Kalyuzhnaya et al., 2018; Liu, et al., 2017; Chang et al., 2018). 생물전기화학반응조에서 메탄의 감소는 methanotrophs의 대사작용에 의한 메탄의 산화에 의한 것으로 보인다. 이용가능한 기질이 부족한 석탄으로부터 바이오 메탄을 생성하는 Chemostat에서는 Methanotroph의 활성이 높아지며, 전극에 전압을 인가하면 Methanotrophs의 활성이 더욱 높아지는 것 같다. 그러나 이용 가능한 분자형태의 산소가 존재하지 않을 때 Methanotrophs는 전자수용체로서 황산염, 아질산염 및 질산염을 사용한다(Wang et al., 2015; Gao

et al., 2017). 최근에 Methanotrophs는 생물전기화학적 혐기성 소화조에서 메탄을 산화시키는 전자수용체로 산화전극을 사용할 수 있고 이용 가능한 기질이 고갈되었을 때 methanogens를 능가할 수 있음이 밝혀졌다(Gao et al., 2017; Liu et al., 2017). 기질이 고갈된 상태에서 전압이 인가되어 있고 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로 구성된 BEF1과 BEF2의 생물전기화학적 혐기성 회분식 소화조는 Methanotrophs를 풍부하게 할 수 있는 조건이다. methanotrophs는 석탄의 생물학적 메탄전환에 중요한 역할을 하는 것으로 보이거나 향후 더 많은 연구가 필요하다.

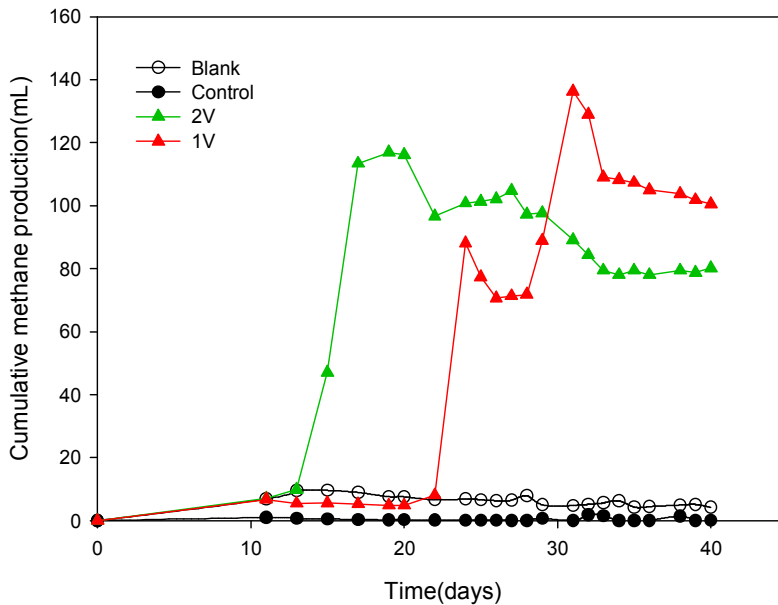


Fig. 3.2. Cumulative methane production in bioelectrochemical anaerobic.

전압을 인가하지 않은 대조구에서 메탄생성량은 매우 작았으며, 공시료 소화조보다 작았다(Fig. 3.2). 공시료 소화조에서 메탄은 접종물에 잔류한 유기물의 분해에 의해 생성된 것이다. 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물은 대조구의 메탄전환에 억제효과가 있는 것으로 보인다. 혐기성 조건하에 석탄의 가수분해 중간생성물은 long chain fatty acids, polycyclic aromatic hydrocarbons 및

heterocyclic compounds을 포함한다(Wang et al., 2017; Orem et al., 2010). 이들 물질이 발효되어 메탄전구물질을 생성하는 반응이 석탄의 생물학적 메탄전환공정의 율속단계로 알려지고 있다(Wang et al., 2017).

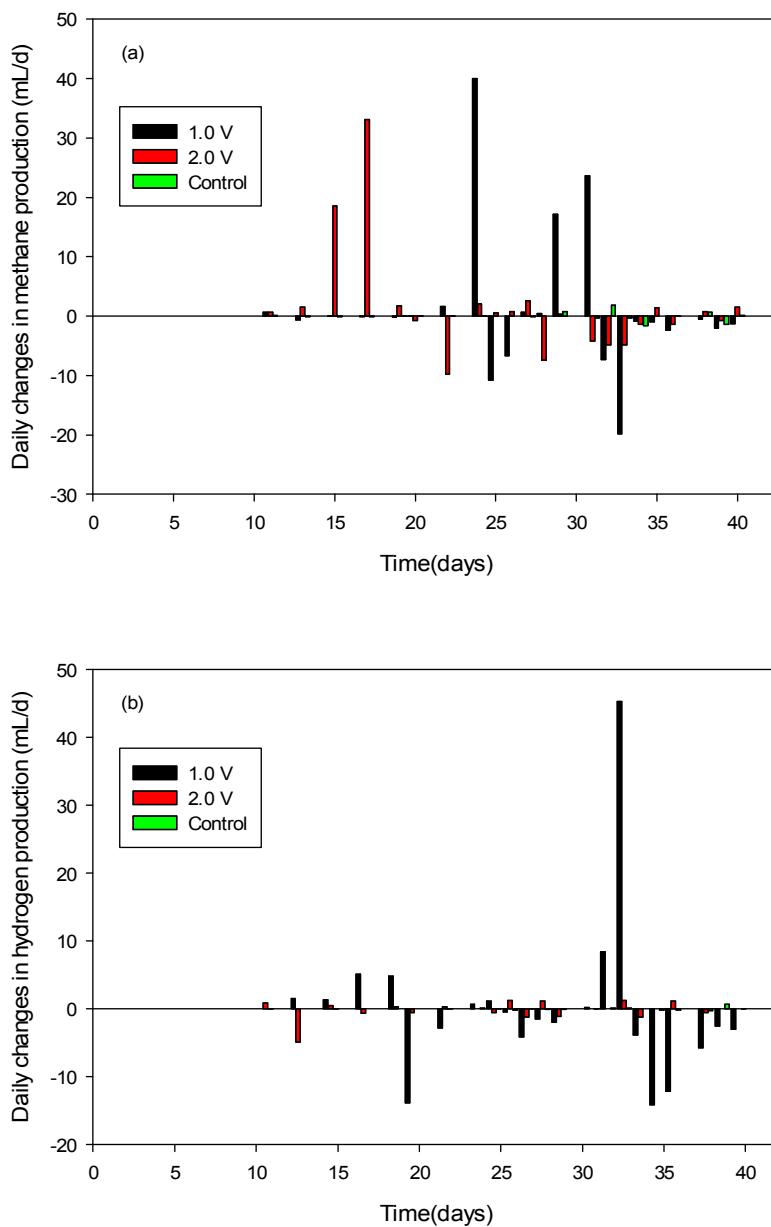


Fig. 3.3. Daily changes in (a) methane production and (b) hydrogen production.

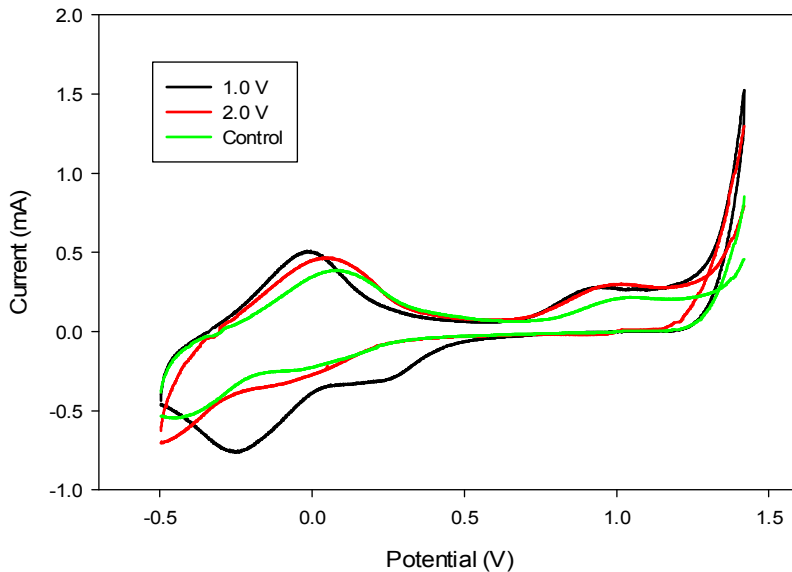


Fig. 3.4. Cyclic voltammogram in the bulk solution for different applied voltages.

이전 연구에서 혐기성 소화조에서 석탄의 메탄 전환은 30일에서 85일 사이에 관찰되었다(Davis et al., 2018; Orem et al., 2010). 대조구 소화조를 좀 더 오랜 기간 운전하여 석탄의 가수분해 중간생성물질에 적응된 산발효균과 메탄생성균이 enrich 되면 추가적으로 메탄이 발생할 가능성은 있다. 그러나 예상되는 메탄 발생량은 여전히 수 mL/g coal 이하로 작다.

대조구에서 수소소비와 메탄발생량의 상관관계는 전압을 인가한 BEF1 와 BEF2 보다 다소 높았다. 이것은 대조구에서 메탄발생이 메탄생산 전구물질인 초산이나 수소를 경유하는 중간 간접전자전달에 의해 이루어짐을 의미한다. 대조구에서도 벌크용액의 CV에서도 산화환원피크가 0.08/-0.24 V vs. Ag/AgCl ($E_f = -0.08$ V) 및 1.03/0.15 V vs. Ag/AgCl ($E_f = 0.59$ V)에서 각각 발견되었다. 그러나, 소량의 메탄생성은 대조구의 전자활성미생물이 메탄생성을 위한 전자전달에 기여하지 않는다는 것을 나타낸다.

Table 3.1 Summary of biogenic conversion of coal to methane in bioelectrochemical anaerobic reactor

Contents	Control	BEF1	BEF2	
CH ₄ yield (mL/g lignite)	0.75	54.5	43.7	
SCOD residual (g/L)	4.66	3.62	4.09	
VFAs residual (g COD/L)	0.57	0.18	0.15	
Redox peaks in CV	Ep,ox/Ep,red (V vs. Ag/AgCl)	0.083/−0.241; 1.031/0.154	−0.014/−0.2 39; 0.913/0.025	0.055/−0.286; 0.986/0.135
	Ef (V vs. Ag/AgCl)	−0.079; +0.593	−0.127; +0.469	−0.116; +0.561
	Ip,ox/Ip,red (mA)	0.331/0.238; 0.113/0.148	0.473/0.356; 0.217/0.253	0.407/0.244; 0.146/0.011
	Alkalinity (mg/L as CaCO ₃)	Initial Final	3824 4026	3824 4182 4462
	pH	Initial Final	7.36 7.79	7.36 8.06 7.92
VSS (g/L)	Initial	9.25	9.25	
	Final	5.05	6.10	
		9.25	7.95	

3.3.2 석탄의 가수분해 생성물의 메탄전환 가능성

석탄의 바이오메탄전환을 위한 생물전기화학 혐기성 회분식 반응조에서 뚜렷한 메탄생성이 관측되지 않았을 때 회분식실험을 종료하였다. 그러나, 흥미롭게도 운전 종료시점에 BEF1 및 BEF2에서 SCOD는 각각 3.62g/L 및 4.09g/L이었으며, 대조구는 4.66 g/L로 크게 높았다 (Table 3.1). 이와 같이 혐기성 회분식 소화조에서 유기물 농도가 충분히 존재하지만 메탄이 발생하지 않은 것은 잔류 유기물들이 혐기성미생물이 이용하기 어려운 난분해성물질이거나 또는 혐기성미생물이 잔류 유기물의 독성에 의해 메탄 전환에 대한 활성을 상실한 것으로 추측된다. 생물전기화학 혐기성 회분식 실험에서 pH는 초기에 7.34이었으나 운전시

간 경과에 따라 7.79-8.06으로 크게 증가하였다 (Table 3.1). 혐기성 소화조에서 pH는 산발효반응에 의해 생성된 VFA의 축적에 의해 감소하며, 알카리도 성분의 증가에 의해 높아진다(Feng et al., 2016; Feng et al., 2017). 회분식 소화조의 초기 알카리도는 3,824mg/L as CaCO₃에서 약 4,500 mg/L as CaCO₃로 증가하였으나 VFA의 잔류수준은 매우 낮았다(Table 3.1). 알카리도 성분은 메탄생성, 산화환원과 같은 환원반응과 단백질과 같은 질소화합물의 분해에 의해 생성되는 암모니아에 의해 생성된다(Feng et al., 2016; Feng et al., 2017). BEF1 및 BEF2에서 석탄의 메탄전환을 위한 회분식 소화조에서 메탄발생량은 116.92-136.27mL로서 메탄생성반응이 알카리도의 증가에 크게 기여하지 않았음을 의미한다. 한편, VSS는 초기 9.25 g/L에서 6-8 g/L로 감소하였으며, 이것은 산발효균 및 메탄생성균 등 혐기성 미생물이 이용가능한 기질이 석탄의 분해로부터 충분히 공급되지 않아 미생물 세포의 용균현상이 일어났을 가능성이 크다. 따라서, 알카리도의 증가는 세포의 용균현상으로부터 생성된 암모니아에 기인하였을 가능성이 높다. 한편, 공시료 실험에서 최종 잔류 SCOD인 1.24g/L 정도이었다. 이것은 혐기성 회분식 소화조에서 잔류한 SCOD 중에서 공시료 실험에서 최종 잔류 SCOD 정도는 미생물 세포에 기인한 물질임을 의미한다. 그러나, 나머지 2.38-3.42 g/L SCOD는 석탄의 가수분해 산물로 볼 수 있다.

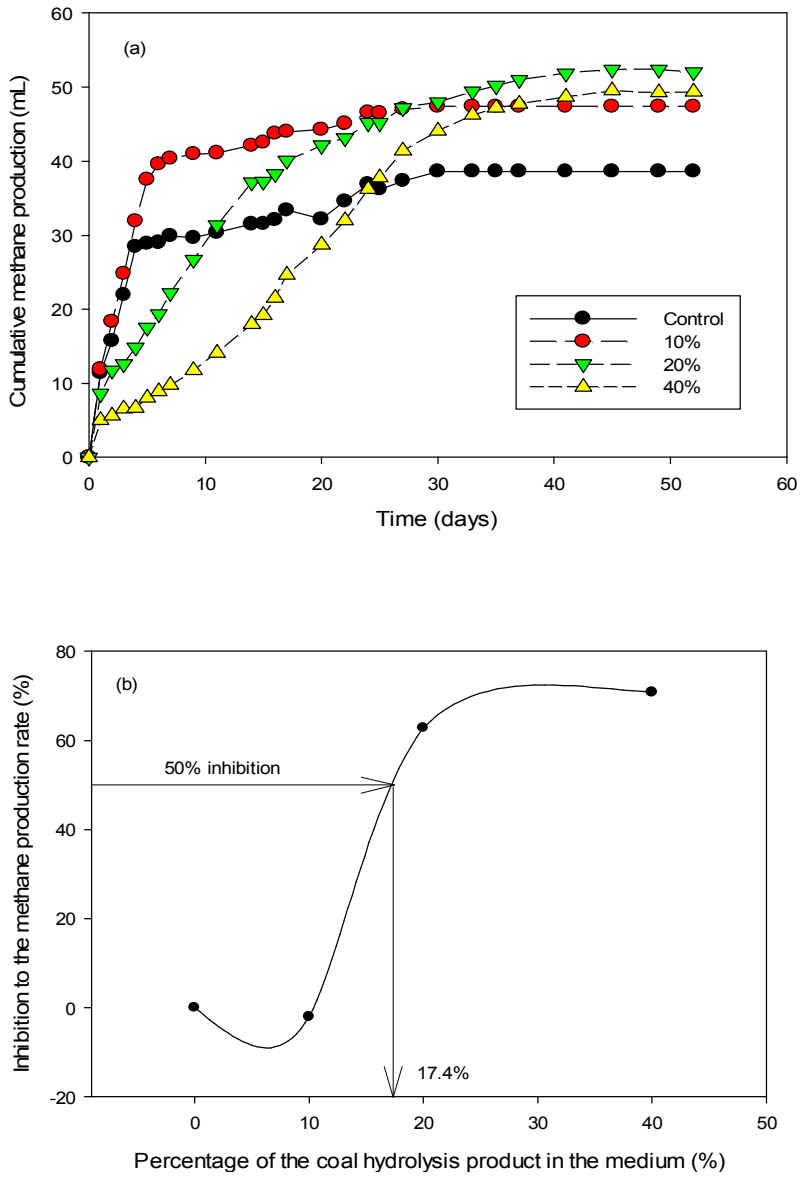


Fig. 3.5. (a) Cumulative methane production and (b) the inhibition to the methane production depending on the amount of the coal hydrolysis product added in the anaerobic toxicity test.

이전 연구에 의하면 석탄이 가수분해되어 생성되는 중간생성물질은 난분해성 방향족화합물들이다(Wang et al., 2017; Davis et al., 2018; 13). 이러한 방향족 물질들은 carboxylation, hydroxylation, methylation 등을 통한 ring opening 반응을 거친 후 메탄의 전구물질인 초산 등으로 전환되는 것으로 알려지고 있다(Nzila, 2018). 모든 혐기성 회분식 소화조에서 PCOD의 초기값은 11.28g/L이었고 석탄의 메탄전환 실험에서 0.51~1.01g/L로 감소하여 석탄을 함유한 PCOD이 적어도 91~96% 가수분해 되었음을 나타냈다. 그러나 BEF1 과 BEF2에서 측정된 용액의 VFAs는 0.15g COD/L~0.19g COD/L로서 매우 낮았다. 이것은 석탄의 가수분해 반응에 의해 생성되는 중간생성물질들이 메탄전구물질인 초산이나 수소로 전환되는 과정이 석탄으로부터 생물학적 메탄전환 반응의 율속단계이거나 이러한 중간생성물질들이 산발효균 및 메탄균의 활성을 저해한다는 것을 의미한다(Wang et al., 2017; Orem et al., 2010).

석탄의 가수분해에 의해 생성된 중간생성물의 혐기성 독성실험에서 메탄생성은 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 함량에 따라 크게 영향을 받았다(Fig. 3.5a). 혐기성 독성실험에서 중간생성물이 없는 대조구의 최대메탄생성속도는 6.36 mL/d이었다. 혐기성 배지에 10%의 중간생성물을 첨가한 경우 최대메탄발생속도는 6.49 mL/d로서 오히려 약간 증가하였다. 그러나, 중간생성물의 함량이 20%, 40%로 증가할 때 최대메탄발생속도는 각각 2.36 mL/d, 1.86 mL/d로 감소했다. 이는 최대 메탄생성량이 각각 62.9% 그리고 70.8% 저해되었음을 나타낸다. 이는 가수분해 및 산발효 중간생성물이 메탄생성에 대한 기질 저해 효과를 가지고 있으며 최대메탄발생속도에 대한 중간생성물의 저해효과를 선형으로 평가하면 중간생성물이 5.7배 희석 될 때 최대 메탄생성속도가 50% 억제되었음을 시사한다(Fig. 3.5b). 그러나, 최종메탄생성량은 중간생성물을 10% 주입한 경우 47.4 mL로서 대조구의 38.6 mL 보다 높았다. 중간생성물을 20%, 40% 주입하였을 때는 최종 메탄생성량이 52.4 mL 및 49.5 mL로 크게 증가하였다. 궁극적인 메탄생성은 혐기성 배지에 첨가된 가수분해 및 산발효 중간생성물의 함량 증가에 의존하며 대조구에 비하여 증가한 메탄생성량은 중간생성물을 분해하여 대사한다는 것을 나타낸다. 본 연구에서 대조구의 메탄 수율은 175.2mL/g CODr

이었다. 그러나, 가수분해 및 산발효 중간생성물의 수율은 156.4~142.3 mL/g CODr로서 중간생성물의 함량에 반비례하였다(Table 3.2). 이것은 가수분해 및 산발효 중간생성물이 혐기성 미생물에 독성이 있음을 의미한다. 석탄을 기반으로 한 가수분해 및 산발효 중간생성물의 메탄 수율은 중간생성물이 10%에서 40%로 증가했을 때 106.3 mL/g CODrCHP (55.3 mL/g lignite)에서 85.4 mL/g CODrCHP (44.4 mL/g lignite)이었다. 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물이 희석 될 경우 메탄 수율은 중간생성물의 함량에 의존할 수 있음을 나타낸다. 그러나 메탄생성에 대한 가수분해 및 산발효 중간생성물의 기질 저해는 추가적인 심층 연구를 통해 완화될 수 있다.

Table 3.2 Summary of the anaerobic toxicity of the hydrolysis product of coal to methane conversion

Parameter	Control	10%	20%	40%
Pu(mL)	38.6	47.4	52.4	49.5
μ (mL/d)	6.36	6.49	2.36	1.86
λ (d)	0	0	0	4.65
Total CH ₄ yield (mL/g CODr)	175.2	156.4	146.2	142.3
CH ₄ from CHP (mL/g CODr CHP)	0.00	106.3	100.0	85.4

(CHP: coal hydrolysis product, g COD).

3.3.3 시사점

석탄은 지구상에서 가장 많이 매장 된 화석 연료이며 전세계 에너지 생산량의 약 30 %를 차지한다(Zhang et al., 2016; Fuertez et al., 2017; Huang et al., 2013). 그러나 석탄은 연소중에 분진, 황산화물, 질소 산화물 및 이산화탄소와 같은 여러 가지 오염물질을 방출한다(Zhang et al., 2016; Ryu et al., 1993; Yi et al., 2017). 메탄은 청정에너지원인 천연가스의 주요성분으로서 석탄의 생물학적 메탄전환은 안정적이고 지속 가능한 에너지 자원의 개발을 확보하는 데 중요하다. 그러므로 석탄의 생물학적 메탄전환을 향상시키기 위한 여러가지 물

리화학적 및 생물학적 시도가 있었다(Zhang et al., 2016; Yi et al., 2017). 그럼에도 불구하고, 메탄생성량은 수 mL/g lignite 이었으며 메탄생성기간은 30 일에서 85 일이 소요되었다(Zheng et al., 2017; Davis et al., 2018; Song et al., 2016). 석탄의 생물학적 메탄전환 과정은 석탄에 함유된 유기물질의 물리 화학적 특성에 크게 영향을 받으며 석탄에 함유된 유기물질은 일반적으로 long chain fatty acids, polycyclic aromatic hydrocarbons, 및 heterocyclic compounds 로 가수 분해되는 까다로운 리그닌 물질로 구성되어 있다(Wang et al., 2017; Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017). 생물전기화학적 혐기성 소화조에서 1 V 의 전압을 인가하여 석탄의 메탄전환율이 크게 향상되었다. 메탄생성량은 54.5 mL/g lignite 에 도달했는데 (table 3.1), 우리가 아는 한 가장 높은 수치이다. 그러나, 인가전압이 2V로 증가하면, 메탄 수율은 43.7 mL/g lignite 으로 약간 감소하지만 석탄으로부터의 메탄생성은 13일의 더 짧은 지체시간후에 관찰된다. 흥미롭게도, 석탄 가수분해 및 산발효 중간생성물의 SCOD은 여전히 높았으며, 메탄 생산 후 생물전기화학 혐기성 소화조에서 3620-4090mg COD/L의 값을 보였다. 혐기성 독성실험에서 가수 분해 생성물은 약 5.7 배 희석되었을 때 메탄 생성에 대한 50%의 저해효과를 나타냈다. 그러나 중간생성물을 10배 희석하였을 때 메탄전환율은 106.3 mL/g CODr CHP이었다(Table 3.2). 이는 석탄의 생물 전기화학 혐기성 소화조에서 메탄전환은 가수분해 및 산발효 중간생성물을 희석하여 추가로 전환된 메탄생산량을 보정할 때 107.8 mL/g lignite (207.3 mL/g COD in lignite)임을 시사한다. 석탄의 메탄전환 포텐셜은 포도당에서 350mL/g COD보다 낮지만 상업적으로 실행하기에 충분히 높다. 그러나 현장에서 메탄전환에 대한 석탄 가수분해 및 산발효 중간생성물의 저해를 완화하기 위해서는 추가 심층 연구가 필요하다.

3.4 결론

생물 전기 화학적 혐기성 소화조에서 전극의 분극화는 석탄이 메탄으로 전환되는 것을 크게 개선했다. 생물전기화학 혐기성 소화조에서 1.0V로 분극 된 전극은 석탄의 메탄 수율을 54.5mL/g lignite로 증가시켰다. 2V로 분극 된 전극은 메탄생성에 필요한 시간을

단축시키고 석탄전환율을 향상시켰다. 가수분해 및 산발효 중간생성물의 SCOD는 메탄 전환에 대한 기질 저해효과를 나타내었고, 중간생성물이 5.7 배 희석되었을 때 메탄전환율은 50% 억제되었다. 중간생성물을 10배 희석하여 106.3 mL/g CODr의 추가 메탄을 생산했는데 이는 55.3 mL/g lignite 이다. 석탄의 총 메탄 포텐셜은 전극 분극화 및 가수분해 생성물의 희석에 의해 107.8 mL/g lignite로 개선되었다. 그러나 메탄전환에 대한 가수분해 및 산발효 중간생성물의 저해는 추가적인 심층 연구가 필요하다.

제 4 장 효모 추출물과 혐기성 슬러지는 전계의 환경에서 석탄의 생물전기화학적 메탄전환을 크게 개선한다.

4.1 서론

석탄은 현대 문명의 많은 부분을 지원하는 세계적으로 풍부한 에너지원이다. 그러나 석탄은 연소하는 과정에서 미세먼지, 이산화탄소, 황산화물, 질소산화물과 같은 오염물질을 다량 방출한다(Zhang et al., 2016; Ryu et al., 1993; Yi et al., 2017). 석탄은 현재 오염에너지원으로 분류되고 있으나 석탄층메탄은 에너지 함량이 높고 사용하기가 쉬운 온실 가스 지수가 낮은 청정 에너지 원이다 (park and Liang, 2016; Zheng et al., 2017). 따라서 최근에는 신에너지원으로 석탄에서 생성된 메탄(천연가스의 주요성분)에 대한 관심이 급증하고 있다. 특히 석탄층메탄(CBM)은 중요한 천연 가스 자원으로 주목 받고 있으며 현장에서 및 현장 외에서 석탄을 원료로 메탄생산을 향상시키기 위하여 많은 노력을 하여 왔다(Green et al., 2018; Colosimo et al., 2016; Zhang et al., 2016). 석탄의 메탄전환은 열화학적 및 생물학적으로 이루어질 수 있다. 그러나 열화학적인 석탄의 메탄전환은 많은 에너지를 필요로 하고 부산물로 다양한 오염물질을 다량 발생시킨다는 단점이 있다(park and Liang, 2016; Breckenridge and Polman, 1994). 석탄의 생물학적 메탄전환은 혐기성미생물에 의하여 이루어지는데 상대적으로 낮은 온도, 압력의 온화한 조건에서 이루어지기 때문에 환경친화적이다. 그러나 생물학적인 석탄의 메탄전환은 속도가 대단히 느리고, 메탄전환율이 낮아 경제성이 없었다(Orem et al., 2010, Zheng et al., 2017; Piao et al., 2018). 지금까지 석탄의 생물학적인 메탄전환반응을 향상시키기 위하여 다양한 방법들이 시도되었다(Zhang et al., 2016; Fuertez et al., 2017; Davis et al., 2018). 그러나 최근까지 1g의 석탄에서 얻을 수 있는 이론적인 메탄 수율은 석탄의 종류에 의존하지만 여전히 수십 μL 에서 수 mL에 불과하였다(Zheng et al., 2017; Fuertez et al., 2017; Bao et al., 2018; Wang et al., 2017). 석탄은 탄화가 완료되었거나 탄화가 진행 중인 고형물로서 석탄에 함유된 (메탄으로 전

환 가능한) 유기물은 주로 리그닌과 같이 소수성 물질들이다(Colosimo et al 2016; Senthamarakkannan et al., 2016; Strapoc et al., 2011). 따라서, 석탄은 혐기성 미생물에 의해 메탄으로의 전환이 어려운 물질이다. 따라서, 석탄의 bioavailability를 향상시키기 위하여 석탄을 분쇄하여 입경을 감소시키는 방법, 공극율을 높이는 방법, 계면활성제를 주입하는 방법들이 연구되어 왔다(Zhang et al., 2016; Fuertez et al., 2017; Davis et al., 2018). 석탄의 생물학적인 메탄 전환과정에는 다양한 석탄의 분해반응들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 이러한 반응들은 extracellular enzymatic depolymerization, hydroxylation, carboxylation, methylation 및 methanogenesis 등을 포함한다(Strapoc et al., 2011). 석탄의 메탄전환과정에서 생성되는 중간생성물들은 대부분 미생물들이 이용하기 어려운 다환 방향 탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), 방향족 질소 화합물 및 지방족 화합물과 같은 화합물들이다(Harder et al., 2013; Furmann et al., 2013). 석탄의 메탄전환에 관여하는 미생물은 이들 중간 생성물들에 의한 독성에 의해 성장이 억제되어 메탄생성반응이 정상적으로 일어날 수 없었다 (Piao et a., 2018). 따라서, 석탄분해 과정에 생성되는 중간생성물들의 분해와 높은 메탄생성 활성을 가지는 미생물을 주입하는 bioaugmentation 등의 방법들이 시도되어 왔다(Davis et al., 2018; Ghosh et al., 2014). 최근에는 석탄의 분해과정에 필요한 전자수용체를 공급하는 호기성 전처리방법도 연구되고 있다(Wang et al., 2017). 또한, 석탄은 미생물의 성장에 필요한 질소, 인, 미량원소, 비타민과 같은 무기영양분이 결핍된 물질이다. 따라서, 질소, 인과 같은 영양분을 주입하여 혐기성미생물의 성장과 활성을 촉진시키는 biostimulation 방법들이 석탄의 메탄전환효율을 향상시킬 수 있었다(Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2018). 특히, 다양한 영양분을 함유하고 있는 효모 추출물은 석탄의 메탄전환율을 개선하는데 효과적이었다. 그러나, 여전히 석탄에서 전환되는 메탄의 수율은 상업적으로 경제성을 가지기에는 너무 낮았다 (Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2018).

최근 생물전기화학반응조를 이용하면 주목받을 만큼 석탄의 메탄전환율을 크게 향상시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다(Piao et a., 2018). 생물전기화학반응조에는 전기활성균 (체외전자방출균과 전자영양메탄균)이 우점성장하고 이들 사이에

direct interspecies electron transfer (DIET)에 의해 메탄이 발생한다. 전기활성균은 cytochrome C를 세포외벽까지 확장시켜 전자를 외부로 직접전달하거나 외부에서 전자를 직접 받는 균이다(Piao et al., 2018; Feng et al., 2018a). 혐기성소화조에서 유기물이 가수분해되어 산성박테리아에 의해 초산이나 수소와 같은 중간생성물을 생성하고 이들이 최종생성물인 메탄으로 전환되는 간접종간전자이동(IIET)이라는 과정에서 발효중간체를 통해 미생물 중 사잉에서 전자가 전달된다. IIET를 통한 메탄생성은 미생물 중 사이의 생리학적 특성의 차이에 따라 몇 가지 한계가 있다. DIET에 의한 메탄생성은 IIET에 비하여 동력학적으로 그리고 열역학적으로 유리하다(Feng et al., 2018a; Song et al., 2014; Feng et al., 2016). 생물전기화학반응조에서 혐기성 분해반응의 동역학 및 열역학적 제한들은 DIET에 의해 상당히 완화될 수 있다(Feng et al., 2018a; Song et al., 2014; Feng et al., 2016). 최근 보고에 의하면 생물전기화학반응조에서 미생물 군집의 DIET를 향상시키는 방법으로 석탄의 메탄 수율은 54.5ml/g lignite 까지 증가시킬 수 있었다(Piao et al., 2018). 이것은 석탄의 생물학적 메탄전환이 현장에서 실질적으로 사용될 수 있는 가능성을 제공했다. 그러나, 아직까지 석탄의 생물학적 메탄전환은 많은 지체기간을 필요로 하고 있고 메탄 수율을 개선할 여지가 남아있다

본 연구에서는 석탄을 효모 추출물로 개질하여 석탄의 생물학적 메탄전환율을 향상시킬수 있음을 입증하였으며 또한 혐기성 배지에 효모 추출물과 혐기성 슬러지를 보충함으로써 추가로 메탄전환율을 향상시킬 수 있음을 증명하였다.

4.2 재료 및 방법

4.2.1 석탄, 효모 추출물 및 접종물

석탄의 메탄전환연구를 위하여 캐나다산 갈탄(Aquajiny Co., South Korea) 을 준비하였다. 이 갈탄은 VS/TS 28.5%, 0.52 g COD/g coal 이고 함수율이 18.4 % 이었다. 준비된 갈탄은 막자사발을 이용하여 분쇄하고 1 mm 체로 걸러 분말형태로 만들었으며, 105℃에서 12시간 건조시켜 메탄전환 실험에 사용하였다 (Piao et al., 2018). 혐기성 회분식 실험을 위한 배지는 초기농도가

NaH₂PO₄·2H₂O 2.45 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 4.58 g/L, NH₄Cl 0.31 g/L, 그리고 KCl 0.13 g/L, NaHCO₃ 8.4g/L가 되도록 준비하였으며, 소량의 vitamins and trace metals 용액을 이전의 방법에 따라 추가하였다(Feng et al., 2018a). 또한 배지에 yeast extract powder (Becton Dickinson and Company; Sparks, MD21152 USA) 를 1.0g/L이 되도록 주입하였다. Sewage Treatment Plant (Busan, South Korea) 에서 수집한 혐기성 슬러지를 1 mm 체로 거른 후 4°C 냉장고에서 24시간 동안 침전시킨 후 식중균으로 사용하였다. 식중슬러지의 특성은 pH가 7.25 이었으며, 알칼리도와 VSS가 각각 3.70 g/L as CaCO₃, 16.10 g/L 이었다. 식중슬러지의 보충에 사용한 슬러지의 초기 pH는 7.39 이었으며 알칼리도와 VSS가 각각 3.92 g/L as CaCO₃, 17.00 g/L 이었다.

4.2.2 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조

Cylindrical acrylic resin tube를 이용하여 bioelectrochemical anaerobic batch reactor (2세트, 유효부피 0.5L, 직경 8.5 cm, 높이 10 cm)를 제작하였다(Fig. 4.1). 혐기성 회분식 소화조의 상부는 acrylic plate로 이루어진 cover를 flange joint하여 sealing함으로서 혐기성상태를 유지할 수 있도록 밀봉하였다. 소화조 내부에는 교반을 위한 blade를 설치하였다. 블레이드는 steel shaft를 이용하여 반응조 상부에 설치된 DC motor에 연결하였다. Acrylic cover에는 액체 및 가스 sampling ports 그리고 off-gas valve를 설치하였다. 시료 채취구와 가스채취구는 n-butyl bubber stopper로 각각 밀봉하였다. 액체시료 채취구 및 블레이드 축이 통과하는 상부덮개의 하단에는 외부공기의 유출입을 차단하기 위하여 액상에 잠기도록 연장된 sealing tube를 각각 부착하였다. off-gas valve는 고무관으로 부유식 가스수집기(floating type gas collector)와 연결하였다. 부유식 가스수집기의 내부에는 미생물의 번식과 발생한 가스의 재용해를 막기 위하여 황산과 NaCl로 산성화된 포화염수를 채웠다. 대면적(26cm×9cm)과 소면적(5.5cm×7cm)의 티타늄호일(0.1T, Grade 2; Baoji Hong Ya Da Nonferrous Metal Materials Co., Ltd; Baoji, China)을 각각 준비한 뒤 표면을 유전물질(alkyd enamel, 470 g/L volatile organic compounds, Noroo Paint & Coatings Co.,

Anyang, Korea)을 이용하여 코팅하여 전극을 준비하였다. 코팅된 대면적 및 소면적 구리호일은 반응조 내벽과 블레이드 축 밀봉관의 외벽에 각각 환형으로 설치하였다. 내부 및 외부 전극 사이의 간격은 3.3cm이었다. 전극들은 티타늄선과 접속시킨 뒤 외부직류전원(ODA Technologies, CO., Incheon, Korea)의 단자에 각각 연결하였다. 실험을 위하여 각각의 혐기성 회분식 소화조에 혐기성 슬러지 250mL과 yeast extract를 포함한 배지 250mL를 접종물로 주입한 뒤 석탄의 초기 농도가 5g/L가 되도록 갈탄 2.5g을 주입하였다.

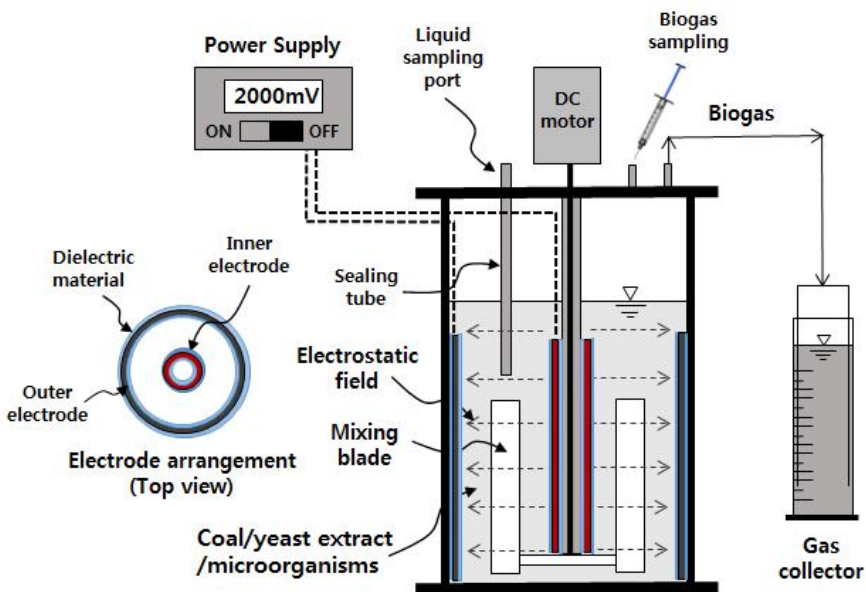


Fig. 4.1. Schematic diagram of bioelectrochemical anaerobic batch reactor.

외부 직류전원을 이용하여 전극사이에 0.5V 및 2V의 전압을 각각 인가하여 별크용액이 0.17 V/cm와 0.67 V/cm의 전기장에 노출되도록 하였다. 이들 혐기성 회분식 소화조는 각각 정전기장 세기를 바탕으로 BER17, BER67로 명명하였다. 준비된 생물전기화학 혐기성 소화조는 온도 조절실(35°C)에서 작동시켰으며 DC모터를 이용하여 블레이드를 약 120 rpm으로 회전시켜 교반하였다. 또한, 전압을 인가하지 않은 반응조를 별도로 준비하여 대조구로 사용하였으며, 접종물에

서 발생한 메탄발생량을 보정하기 위하여 석탄을 주입하지 않은 공시료 반응조를 동일한 조건에서 운전하였다.

각 회분식 소화조에서 더 이상 바이오 가스 발생이 관찰되지 않을 때 초기 접종과 같은 농도의 혐기성 슬러지 및 효모 추출물을 함유한 혐기성 배지는 250mL의 벌크용액을 대체함으로 보충되었다.

4.2.3 분석 및 결과 해석

생물전기화학 혐기성 회분식 실험이 진행되는 동안 액체시료 채취구를 통하여 소량의 수집한 뒤 TS, VS, 총 화학적 산소요구량(TCOD), 용존 화학적 산소요구량(SCOD) 및 VSS를 포함한 물리화학적 특성변화를 모니터링하기 위하여 Standard Method에 따라 분석하였다. pH는 pH측정기(YSI pH1200 laboratory pH meter 115-230V(T1))를 이용하여 측정하였다. 생물전기화학 혐기성회분식 반응조에서 발생한 바이오가스의 조성(메탄, 수소 및 이산화탄소)은 Porapak-Q 컬럼(6ft × 1/8 “, SS)과 TCD(열전도검출기)가 장착된 GC(Gas Chromatograph Clarus 580; PerkinElmer Co., Ltd., Waltham, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 생물전기화학 혐기성 회분식 반응조의 메탄의 누적생성량은 식 4.1을 이용하여 부유식 가스수집기에서 관측된 바이오가스발생량과 바이오가스의 조성으로부터 계산하였다.

$$\text{Equation 4.1: } V_{CH_4} = C_{CH_4}(V_{RH} + V_{GT} + V_{GC})$$

여기서, V_{CH_4} 는 메탄의 누적 생산량(mL)이며, C_{CH_4} 는 모니터링한 바이오 가스에서 메탄의 함량이다. V_{RH} 는 회분식 소화조의 헤드 스페이스 부피이며, V_{GT} 는 소화조와 가스 수집기 사이의 고무 튜브의 부피, V_{GC} 는 가스 수집기의 가스부분 부피이다. 메탄생산량은 식 4.2를 사용하여 수증기압과 온도로 보정함으로서 표준온도 압력(STP)에서의 부피로 변환되었다.

$$\text{Equation 4.2: } V_{CH_4}(mL, STP) = V_{CH_4}(at\ T) \times \frac{273}{(273 + T)} \times \frac{(760 - W)}{760}$$

여기서 T는 35°C, W는 온도 T에서의 수증기압(mmHg)이다. 회분식 소화조에서 실험의 종료직전 벌크용액에 대하여 cyclic voltammetry(CV)실험을 수행하였다. CV 실험에서 작업전극과 대조전극은 각각 작은 스텐망 조각(1cm×1cm)을 이용하였으며, Ag/AgCl 전극을 기준전극으로 사용하였다. CV 실험은 potentiostat(ZIVE SP1, WonA Tech, Korea)를 이용하여 -1.0 V에서 1.0 V 까지 10mV/sec 속도로 스캔하는 방법으로 진행하였다. Smart manager software (ZIVE BP2 Series, WonATech, Kore)를 사용하여 cyclic voltammogram으로부터 redox 피크전위와 전류를 구하였다. 생물전기화학 혐기성소화반응조에서 메탄 생성이 더 관측되지 않을 때 액체시료를 채취하였다. 채취한 시료를 0.45 μ m GF/C(glass microfiber filter/Circles)로 여과한 후 DOC(용존유기탄소)가 1 mg/L로 되게끔 희석하였다. 그리고 Spectrofluorphotometer(RF-6000 SHIMADZU; Wavelength: Excitation (Ex) 220~400 nm/ Emission (Em) 250~600 nm)로 Excitation emission matrix (EEM) spectra를 구하여 갈탄의 분해과정에서 생성된 중간생성물들을 분석하였다(Chen et al., 2003).

4.2.4 DNA 추출 및 미생물 분석

추가식종 이후 메탄생성이 더 이상 관측되지 않았을 때 생물전기화학 혐기성 소화조의 벌크용액으로부터 부유슬러지를 채취하여 미생물군집을 분석하였다. 미생물군집분석을 위해 DNeasy Power Soil Kit의 protocol에 따라 부유슬러지 시료로부터 metagenomic DNA를 추출하였다. 융합 프라이머는 metagenomic DNA에서 16S rRNA 유전자의 가변 영역(V3V4 for bacteria, full for archaea)을 증폭 시키는데 사용하였다(Hur et al., 2011). 16S rRNA는 metagenomic DNA에서 증폭하였으며, MiSeq Personal Sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하여 sequencing하였다. Sequencing 라이브러리의 구축 및 증폭, 생물 정보학 분석은 이전 연구를 따랐다 (Chun et al., 2010). Chimera는 EimTaxon 데이터베이스(<http://www.ezbiocloud.net/>)에서 확인되었으며 microbial communities 과 statistical taxonomic assignments 및 microbial populations은 OTU(Operational Taxonomic Units)를 사용하여 얻었다. CLcommunity 소프트웨어

어 (ver 3.46, Chunlab, Inc., Seoul, Korea)를 사용하여 미생물 군집의 풍부함과 균등성을 포함한 알파 다양성을 분석했다. Intermicrobial community의 종 유사성은 R에서 factoextra package를 사용한 주성분 분석에 의해 결정되었다.

4.3 결과 및 고찰

4.3.1 석탄의 생물전기화학적 메탄전환

BER67(생물전기화학 혐기성 회분식반응조의 벌크용액을 0.67 V/cm의 전기장에 노출시킨 소화조)와 대조구의 누적메탄생성량은 혐기성 소화조에서 식중 직후 공시료 소화조와 유사하게 급격히 증가하였다(Fig. 4.2). 공시료 소화조의 메탄 생성은 기질에 대한 혐기성 미생물의 초기 적응이 혐기성 회분식 소화조에서 메탄생성에 어떤 영향을 미치는지에 대한 유용한 통찰력을 제공한다. 혐기성 배지에 주입한 효모 추출물은 혐기성미생물의 성장에 필요한 아미노산 등의 쉽게 생분해 가능한 유기물질과 비타민, 미량 무기물질 등 미생물의 성장에 필요한 영양소들을 함유하고 있다(Zhang et al., 2017; Ritter et al., 2015). 이것은 아미노산이 공시료 소화조에서 초기 메탄생성의 주요 기질이었고 필수 영양소가 혐기성 미생물의 적응을 촉진하여 아미노산으로부터 메탄을 즉시 생산할 수 있음을 나타낸다.

BER67에서 누적메탄발생량은 237.2 mL까지 서서히 포화되었지만 대조구에서의 누적메탄발생량은 시간이 지남에 따라 감소했다(Fig. 4.2a). 일반적으로 석탄입자는 가수분해 및 산발효 후에 메탄으로 전환될 수 있으며 가수분해하여 생성되는 중간체는 혐기성 미생물이 대사하기 어려운 macromolecular acids, polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic compounds 및 phenols과 같은 난분해성 유기물질로서 메탄생성균에 대한 억제효과를 가진다(Piao et a., 2018; Nzila, 2018). 이전 연구에서도 대조구에서의 누적메탄발생량은 본 결과와 유사하게 시간이 경과함에 따라 감소했다(Piao et a., 2018). 메탄을 산화하는 methanotrophs는 대조구에서 풍부하게 보였으나 메탄생성은 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 축적에 의해 억제된 것으로 보인다(Piao et a., 2018). methanotrophs는 산소, 황산염 및 질산염과 같은 전자수용체의 존재하에서

alkanes, aromatics, halogenated alkanes를 분해하는 것으로 알려져있다(Gao et al., 2015; Wang et al., 2015). 그러나 전자수용체가 존재하지 않는 대조구에서 메탄이 어떻게 감소되는지를 설명하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. BER67에서 electroactive EB 및 EMA는 0.67 V/cm의 정전기장으로 인해 enrich 된 것으로 보인다. 이것은 BER67의 누적메탄발생량이 포화될 때까지 EB와 EMA사이의 DIET를 통해 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로부터 메탄전환이 진행되었음을 나타낸다(Piao et al., 2018). 흥미롭게도 BER17의 초기메탄생성량은 공시료 소화조보다 낮았다. 메탄생성량은 시간이 경과함에 따라 증가하였지만 증가량은 대조구의 메탄생성량보다 적었다. 이것은 정전기장이 석탄의 가수분해 및 산발효뿐만 아니라 가수분해 중간생성물의 메탄전환에도 영향을 미친다는 것을 시사한다. 석탄의 가수분해 및 산발효로 인해 BER17 및 BER67의 전기활성미생물의 활성을 저해하는 중간생성물이 빠르게 축적될 가능성이 있다. 그러나 0.17 V/cm의 낮은 정전기장이 가수분해 및 산발효 중간생성물을 대사시켜 DIET를 효과적으로 유도하지 못하는 것으로 보인다. 최근 석탄의 생물학적 메탄전환은 생물전기화학 소화조에서 상당히 개선될 수 있지만 이 과정은 메탄생성에 긴 적응시간을 필요로 한다(Piao et al., 2018). 상기 결과는 0.67 V/cm의 정전기장에서 석탄을 효모 추출물로 개질함으로써 석탄의 생물학적 메탄전환이 크게 개선될 수 있음을 시사한다.

BER67에서 22일 후 메탄생성이 더 이상 관측되지 않았지만 BER67에 잔류된 유기물의 SCOD는 3249 mg/L로 높게 유지되어 BER67이 잔류 SCOD로부터 메탄을 추가적으로 생성할 수 있는 잠재력을 보유하고 있음을 나타낸다. BER67에서도 시간이 경과함에 따라 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물은 고도로 축적되고 그들의 독성으로 인해 DIET 경로로 메탄을 생성하는 EB와 EMA는 활성을 상실했을 가능성이 크다. 석탄의 메탄생성을 위한 혐기성 회분식 소화조에 30일 후 혐기성 슬러지와 효모 추출물을 함유한 배지가 보충되었다. 메탄생성량은 즉시 다시 급격히 증가하였으며 BER67에서 누적메탄생성량은 393.4 mL의 최대 값에 도달하였다(Table 3.1). 그러나 다른 회분식 소화조의 누적메탄생성량의 증가는 BER67에 비해 현저하게 적었다. 이것은 EB와 EMA사이의 DIET가 0.67 V/cm의 정전기장세기의 조건에서 효모 추출물과 혐기성 슬러지를

보충하여 다시 활성화되었으며 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로부터 추가로 메탄이 생성되었음을 나타낸다.

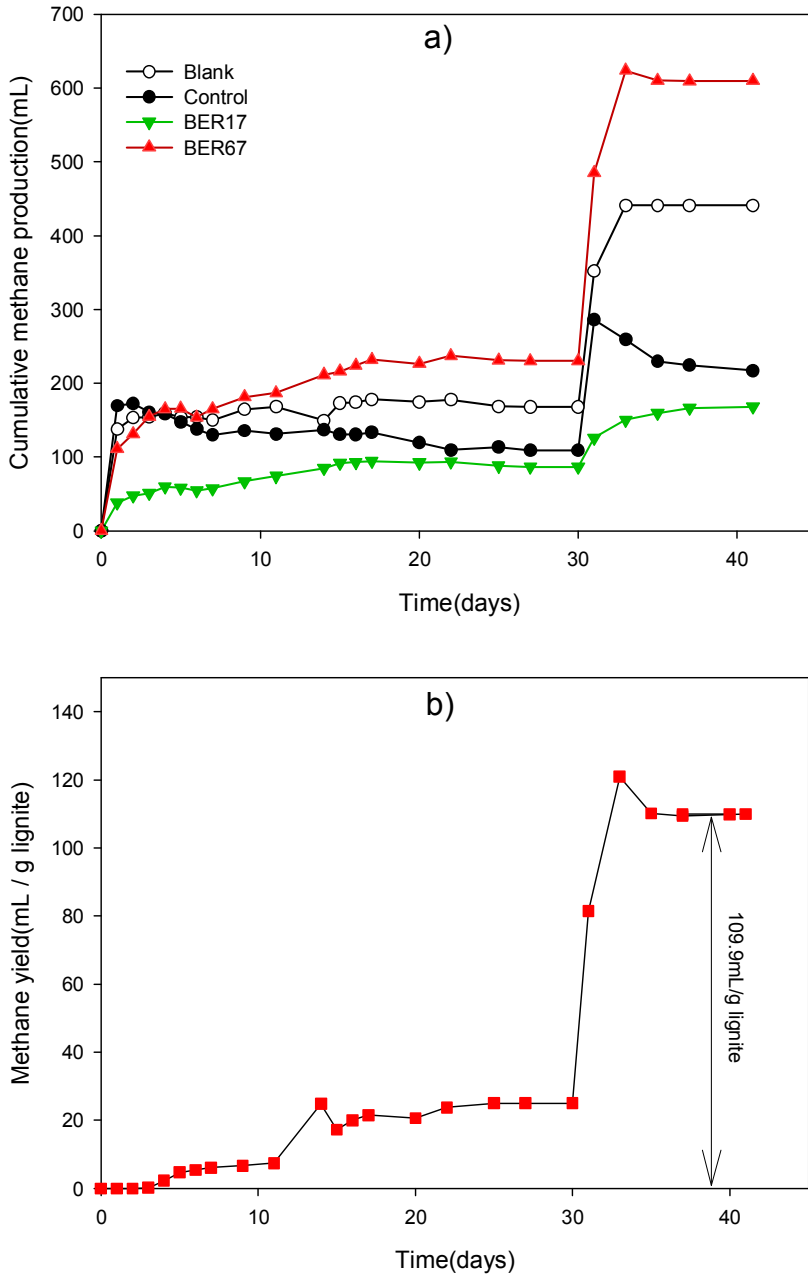


Fig. 4.2. (a) Cumulative methane production from coal and (b) methane yield of coal enhanced by yeast extract and an electric field(0.67V/cm).

석탄의 메탄 수율은 석탄의 생물학적 메탄전환의 상업화 가능성에 있어서 중요한 요소이다. 기존의 혐기성 소화에서는 석탄의 영양보충 또는 호기성 전처리를 사용하여 석탄의 메탄 수율을 향상시킬 수 있었지만 2.93-7.4 mL/g coal로 낮았다(Zheng et al., 2017, Davis et al., 2018). 그리고 우리가 아는 한 지금까지 보고된 석탄으로부터 전환된 메탄 수율의 최대 값은 생물전기화학소화조에서 얻은 54.5 mL/g lignite 이었다(Piao et al., 2018). 이 연구에서 효모 추출물로 개질된 석탄의 총 메탄 수율은 효모 추출물과 혐기성 슬러지를 보충한 후 109.9 mL/g lignite이었으며(Fig. 4.2b), 이는 우리에게 알려진 가장 높은 수율이며 이 생산량은 석탄의 생물학적 메탄전환을 현장의 메탄전환에 대한 적용 가능성을 크게 향상시켰다.

4.3.2 석탄의 생물전기화학적 가수분해 및 발효

석탄의 가수분해 및 산발효 생성물의 생분해도와 메탄균에 대한 독성은 석탄의 메탄전환반응에 큰 영향을 미친다. 석탄의 메탄전환을 위한 초기 회분식 실험에서 BER67과 대조구에서 식중 직후 3일동안 급격하게 발생한 누적메탄발생량은 공시료 소화조와 유사했다(Fig. 4.2a). 효모 추출물에 함유된 쉽게 분해 가능한 아미노산이 실험초기에 급격하게 분해되어 메탄을 발생시킨 것으로 보인다. 그러나 석탄의 메탄전환반응을 장시간 지속하였을 때 대조구와 BER17 및 BER67에서의 누적메탄발생량은 큰 차이를 보였다. 이것은 석탄의 생물학적 메탄전환반응은 전계강도와 석탄의 가수분해 및 산발효 생성물의 축적에 크게 의존한다는 것을 나타낸다. 그 후 BER67의 메탄생성은 서서히 포화되어 더 이상 관찰되지 않았다. 그러나 BER67의 잔류 SCOD는 3249 mg/L로 대조구의 2,656 mg/L보다 높았다(Table 4.1). 공시료 소화조에서 실험 초기 메탄발생량은 급격하게 증가하였지만 기질이 고갈됨에 따라 초기 메탄생성은 더 이상 유지되지 않았다. 이것은 잔류 SCOD가 석탄의 가수분해 및 산발효에 의해 생성된 중간생성물로 구성되어 있음을 시사한다. 한편 대조구의 누적메탄발생량은 점차 감소하는 경향을 보였다. 이것은 혐기성 미생물은 대조구에서 가수분해 및 산발효 중간생성물을 거의 대사하지 못하며 methanotrophs가 점차 풍부해졌다는 것

을 의미한다. 따라서 BER67 및 대조구의 잔류 SCODs는 각각 메탄생성반응을 저해하는 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 한계농도로 보인다. 메탄생성에 대한 중간생성물의 저해효과는 이전 연구에서 나타난 것처럼 희석에 의해 완화될 수 있다(Piao et al., 2018).

Table 4.1 Methane conversion of coal in bioelectrochemical reactors exposed to an electrostatic field

Content		Control	BER17	BER67
Cumulative CH ₄ (mL)	Initial batch	172.2	94.2	237.2
	Additional batch	177.1	172.2	393.4
Total CH ₄ yield (mL/g lignite)	Initial + additional	—	—	109.9
	End of initial batch	2656.1	2608.7	3249.0
SCOD (mg/L)	End of additional batch	1314.8	2024.3	1001.7

그러나 석탄의 메탄전환을 더욱 개선하기 위해서는 이들 중간생성물을 확인하는 것이 필요하다. EEM 스펙트럼에서는 BER67의 잔류 SCOD가 humic acids, fulvic acid, hydrophobic acid 를 포함한 다양한 난분해성 물질들로 구성된 것으로 나타났다. 그러나, 290-360nm/220-230nm (emission/excitation: (Em/Ex)) 영역에서 확인된 aromatic compounds 및 400-525nm/220-280nm (Em/Ex) 영역의 hydrophobic & fulvic acid like 성분들은 다른 소화조들에 비하여 뚜렷하게 높았다 (Fig. 4.3a). 이 성분들은 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물질들과 유사하며 이전 연구에서 보고된 생물이용성이 낮고 독성이 있는 난분해성 화합물질들이다 (Orem et al., 2010; Gosh et al., 2014; Wang et al., 2017). 일반적으로 석탄 가수분해 생성물들 중에서 방향족 화합물들이 메탄으로 전환되기 위해서는 carboxylation, hydroxylation, methylation 등의 반응을 통한 ring opening 과정을 거친 후 메탄의 전구물질인 초산, 수소 등으로 전환되어야 하는 것으로

알려지고 있다 (Nzila, 2018). 이것은 메탄전구물질로 발효되는 과정이 석탄의 생물학적 메탄전환반응의 율속단계임을 시사한다. 메탄생성을 위한 DIET은 초산, 수소와 같은 중간생성물을 거치는 메탄생성반응(IIET)보다 독성물질이나 환경조건에 영향을 적게 받는 것으로 알려지고 있다 (Feng et al., 2018a; Yuan et al., 2011). BER67에서의 SCODs 한계농도가 대조구보다 높았다. 이것은 EB와 EMA가 BER67에서 0.67 V/cm의 정전기장에 의해 enrich 되었고 전기활성균들의 DIET에 의해 메탄이 생성되었음을 시사한다. 생물전기화학 혐기성 소화조에 서 관측되는 cyclic voltammogram(CV)의 redox peaks는 일반적으로 EB, EMA 및 전자전달매개체들에 의해 생성된다(Feng et al., 2018a; Harnisch and freguia, 2012). 초기 혐기성 소화조에서 누적메탄생성량이 포화되었을 때 BER67의 산화/환원 피크는 0.05 V/-0.41 V vs. Ag/AgCl에서 관찰되었고(Fig. 4.4), 산화/환원 전류는 각각 0.83 mA/0.40 mA로 나타났다. BER67의 피크 전류는 BER17보다 높지 않았으며, 또한 이들은 모두 대조구보다 낮았다. 미생물이 대사할 수 있는 기질이 고갈되었을 때 일어나는 미생물 세포의 용균현상은 미생물 세포의 내부물질을 벌크용액으로 방출한다. 이러한 물질은 cytochrome, flavin 및 quinone과 같은 다양한 산화/환원 물질을 포함한다(Okamoto et al., 2016; Coursolle et al., 2010). BER17 및 대조구의 산화/환원 피크는 각각 0.04 V/-0.37 V 및 0.05 V/-0.30 V vs Ag/AgCl에서 관찰되었다. 생화학 반응에 관여하는 이동전자는 물질의 종류에 따라 산화/환원 전위가 필요하다. 혐기성 소화조에서는 표준상태에서 산화/환원 전위가 -0.44V vs Ag/AgCl 이하일 때 열역학적으로 이산화탄소가 환원되어 메탄이 생성될 수 있다(Piao et al., 2018). 대조구에 존재하는 산화/환원 물질은 석탄을 메탄으로 전환시키는데 사용되는 전자전달에 관여하지 않았을 수 있다. 그러나 정전기장은 전자전달을 촉진할 수 있다. 정전기장을 소유하고 있는 생물전기화학 혐기성 소화조에 있어서 EB 및 EMA는 기존의 혐기성 소화에서 나타나는 산화/환원 전위와 비교하여 산화에 대해서는 보다 음의 전위에서 전자를 이동시킬 수 있으며 환원에 있어서는 보다 양의 전위에서 전자를 이동시킬 수 있다. 일반적으로 생물전기화학반응에 있어서 EB 및 EMA의 산화/환원 피크는 -0.43 - 0.5 V vs Ag/AgCl에서 관찰된다(Lim et al., 2017). BER67의 산화/환원 피크는 EB와 EMA의 활성을 반영하는

것으로 보인다. 간접적으로 BER67의 메탄은 두 그룹간의 DIET를 통해 생성되었음을 나타낸다. 그러나 BER17의 메탄생성반응에서는 BER67의 메탄생성반응보다 EB와 EMA 사이의 DIET가 상대적으로 기여하지 못한다.

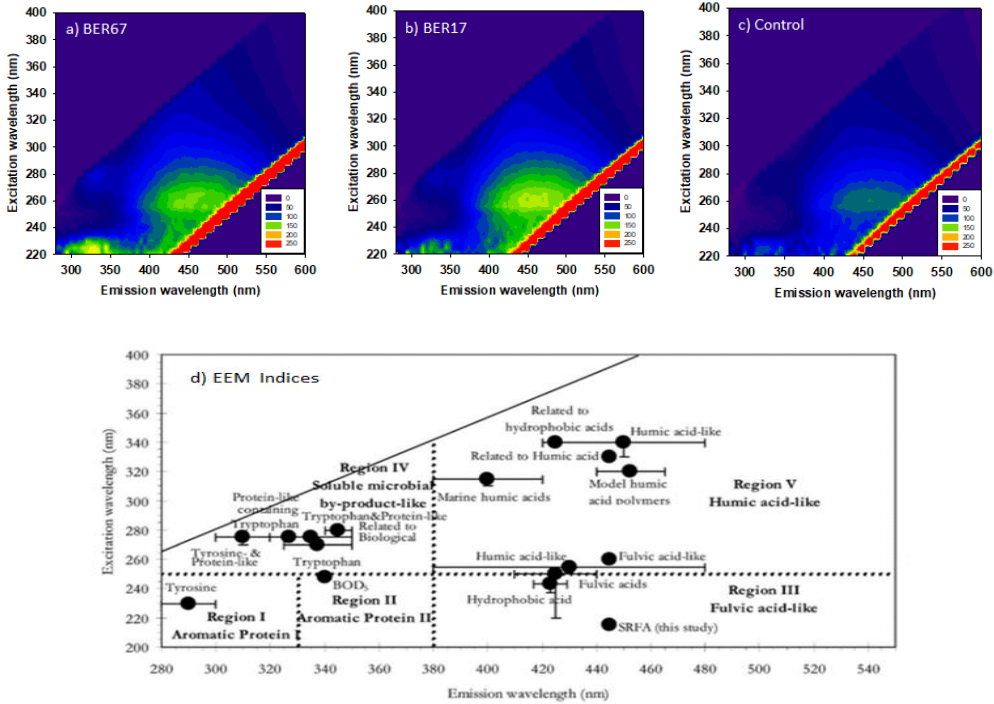


Fig. 4.3. (a) Excitation/Emission Matrix for hydrolyzed products a) BER67, b) BER17, c) Control, and d) EEM Indices.

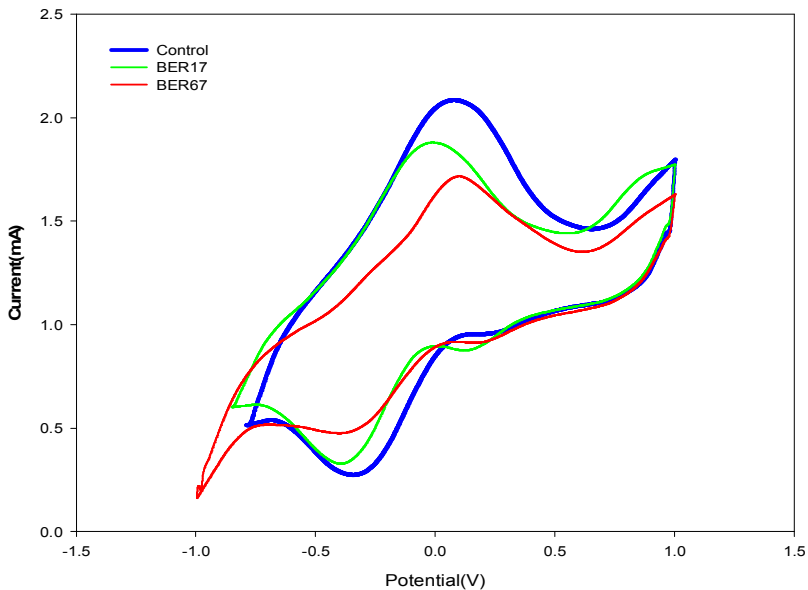


Fig. 4.4. Cyclic voltammogram in the initial batch experiment for the conversion of coal to methane.

BER17에서는 식중독후 발생한 누적메탄량이 공시료 소화조보다 상당히 작았으며, 메탄발생이 완료된 후의 잔류 SCOD는 2,609 mg/L로서 대조구와 비슷하였다(Table 4.1). BER17에서 벌크용액의 EEM 스펙트럼에서 aromatic compounds들의 농도가 상대적으로 낮았으며, hydrophobic acid 및 fulvic acid like 성분들의 농도는 BER67보다 다소 높았다(Fig. 4.3b). BER17에서 효모 추출물에 함유된 쉽게 분해 가능한 아미노산의 메탄전환반응에 대한 저해는 주로 hydrophobic acid 및 fulvic acid like 성분들에 의해 발현되며, hydrophobic acid 및 fulvic acid like 성분들을 발효시켜 메탄을 생성하는 DIET가 BER17에서는 발현되지 않은 것 같다. BER17에서 DIET-base의 메탄생성이 활성화 되지 않았으며 전계강도가 전기활성미생물을 풍부하게 하고 DIET-base의 메탄생성을 유도하는데 중요한 영향인자인 것 같다. 대조구에서는 EEM 스펙트럼이 250-600 nm / 220-400 nm (Em / Ex) 사이에 관찰되었고, 잔류 SCOD의 주성분은 fulvic acid

과 humic acid-like substances로 확인되었다. 대조구에서 혐기성미생물들은 Fulvic acid 및 Humic acid like 성분들과 같은 석탄의 가수분해 및 산발효에 의해서 생성된 중간생성물들에 의해 메탄생성과 관련된 대사과정이 크게 저해를 받는다.

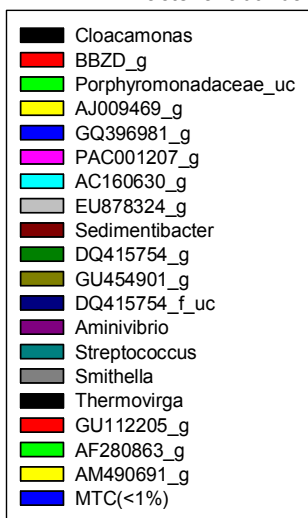
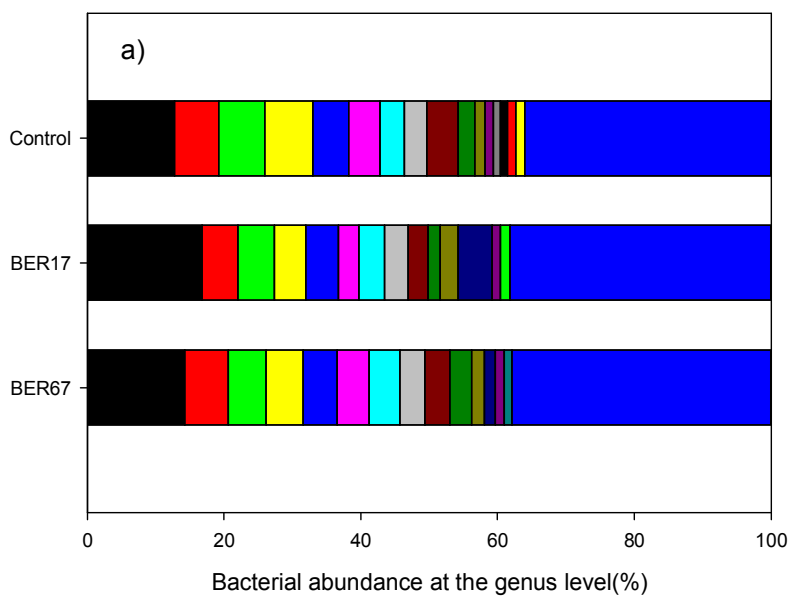
4.3.3 미생물 군집

석탄의 메탄전환실험 종료 후 생물전기화학반응조에서 벌크용액을 채취하여 미생물군집특성을 분석하였다. Bacteria community의 OTUs는 2473~2679종이었으며, Good's coverage of library는 99.5%이상이었다. Bacteria의 Valid reads는 40355~66772로 Total reads의 56.6~72.2%이었다. Archaeal community의 OTUs는 142~315종이었으며, Good's coverage of library는 100%에 달했다. Archaeal의 Valid reads는 무려 105877~112463이었는데 이는 Total reads의 93.7~96.5%이었다. Bacteria군집은 Archaea군집에 비해 Valid reads가 50% 정도로 낮았지만 OTUs는 10배 이상 높았다. 이것은 Bacteria의 다양성이 Archaea의 다양성과 비교하여 풍부도(Jackknife indices)와 균등도(Shannon indices)의 측면에서 상대적으로 높다는 것을 나타낸다(Table 4.2). Bacteria는 BER17에서 종의 풍부도는 다른 샘플보다 상대적으로 높았으나 균등도는 모든 샘플 중에서 가장 낮았으며 BER17에서 석탄 가수분해 물질의 발효에 관련된 Bacteria의 특정종이 우점 성장하였다는 것을 나타낸다. 그러나, BER17에서 Archaea종은 다른 샘플보다 낮은 풍부도와 다양성을 나타냈다. 이것은 BER17에서는 DIET에 의한 메탄생성균이 활성화되지 못하였다는 것을 나타내며, 메탄생성균의 증식은 축적된 가수분해 및 산발효 중간생성물의 독성에 의해 BER17에서 상당히 억제된 것으로 보인다.

Table 4.2 Diversity indices for microbial species in bioelectrochemical anaerobic reactors

Diversity indices	Bacteria			Archaea		
	BER67	BER17	Control	BER67	BER17	Control
Valid reads	40 355	66 772	43 229	105 877	112 463	111 322
Jackknife	2694	2889	2672	222	154	329
Shannon	5.319	5.185	5.353	1.649	0.747	2.04
Good`s coverage of library (%)	99.5	99.7	99.6	100	100	100
OTUs	2473	2679	2503	210	142	315

BER67에서 가장 우점한 bacterial phylum은 Bacteroidetes이며 다음은 Cloacamonas_p, Firmicutes, Proteobacteria와 Chloroflexi의 순으로 우점하였다. 풍부한 genera는 *Cloacamonas* (14.3%), *BBZD_g* (6.3%), *Porphyromonadaceae_uc* (5.5%), *AJ009469_g* (5.5%) 및 *GQ396981_g* (5.0%)로 BER17 및 대조구와 유사하였다(Fig. 4.5a). 그러나 잘 알려지지 않은 속인 *DQ415754_f_uc* (accession DQ415745)는 BER17에서 현저하게 풍부하였다. 이 genus는 이전 연구에서 황화물이 풍부한 대수층으로부터 분리되었다(Macalady et al., 2006).



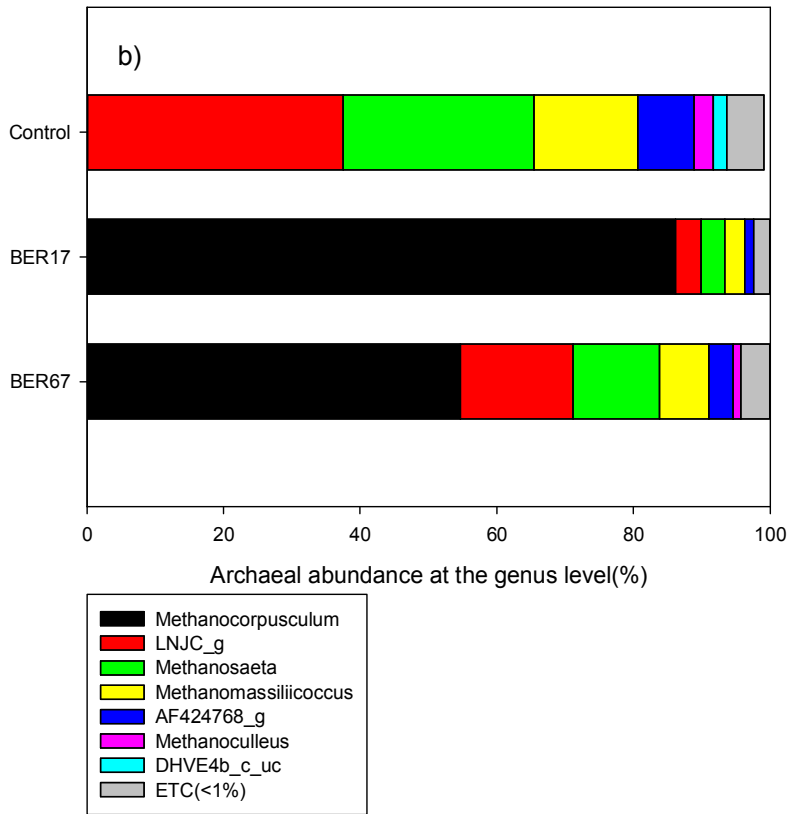


Fig. 4.5. Microbial abundance at the genus level a) bacteria, b) archaea.

주성분분석(principal component analysis: PCA)에서는 bacterial군집의 분산은 86.9% (PC1)와 10.4% (PC2)의 두가지 주요 구성 요소에 의해 설명할 수 있다 (Fig. 4.6a). biplot은 BER67의 bacterial species 군집이 BER17 또는 대조구와는 달리 PC1과 높은 상관관계가 있음을 보여준다. BER67의 bacterial species 군집은 풍부한 species인 *Cloacamonas acidaminovorans* (10.3%), *BBZD_g_uc* (5.6%), *Porphyromonadaceae_uc* (5.5%)에 의해서 가장 큰 영향을 받았다. BER67에서 *C. acidaminovorans*는 아미노산을 발효시켜 탄소와 에너지를 획득하는 syntrophs이며, 생물전기화학반응조에서 자주 발견된다 (Feng et al., 2016; Pelletier E et al., 2008). BER67에서 *C. acidaminovorans* 종은 아미노산을 함유

한 효모 추출물로 인해 더 enrich 된 것으로 보인다. BER17과 대조구에서 bacterial species는 PC1과 양의 상관관계를 보였으나 PC2와는 각각 양과 음의 상관관계를 보였다(Fig. 4.6a) 대조구에서 풍부한 bacterial species는 BER67과 비슷했지만 *C. acidaminovorans* (7.2%)의 함량은 BER67보다 낮았다. BER17에서 bacterial species 군집의 특성은 *C. acidaminovorans* (12.9%), *Porphyromonadaceae_uc* (5.3%) 및 *DQ415754_f_uc* (5.0%)의 영향을 주로 받았다. 이것은 *C. acidaminovorans*은 정전기장에 의해 더 enrich 되었음을 나타내며, 따라서 *C. acidaminovorans*는 exoelectrogenic species일 수 있다.

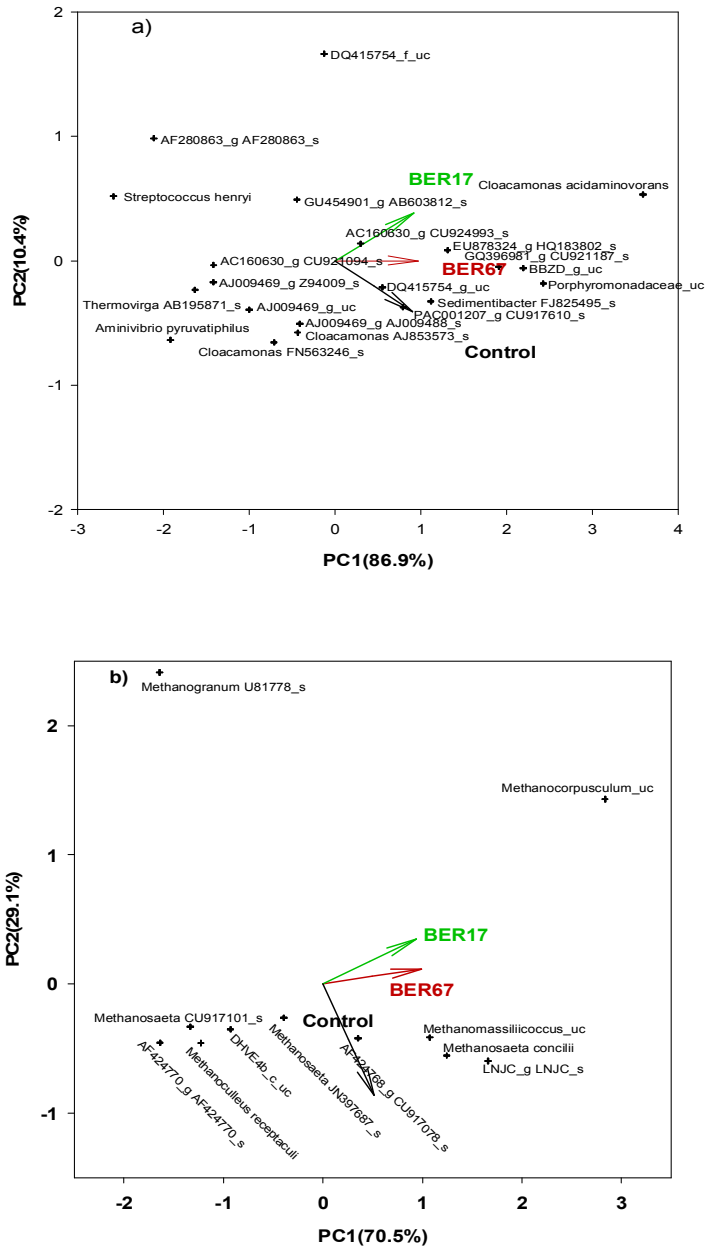


Fig. 4.6. Biplot for the microbial species communities in the bulk solution a) bacteria, b) archaea.

BER67의 archaeal 군집은 BER17 또는 대조구와 현저한 차이가 있었다. BER67에서 풍부한 genera는 Methanocorpuscum (55.0 %), LNJC_g (16.5 %), Methanosaeta (12.7 %), Methanomassiliicoccus (7.3 %)이었다. 그러나 대조구에서는 LNJC_g (37.5 %)가 가장 우점하였으며 Methanosaeta (28.0 %)와 Methanomassiliicoccus (15.1 %)의 순으로 우점하였으나 Methanocorpuscum은 전체의 1 % 미만이었다 Fig. 4.5b) BER17에서는 Methanocorpuscum (86 %)이 우점한 genus 이었고 LNJC_g (3.8 %)와 Methanosaeta (3.5 %)는 상대적으로 덜 풍부했다. PCA에서 archaeal 군집은 두 가지 주요 구성 요소 (PC1, 70.5 %, PC2, 29.1 %)로 설명 할 수 있다 (Fig. 4.6b). Biplot은 BER17과 BER67의 archaeal species 들이 PC1과 상관 관계가 있다는 것을 보여준다. BER67의 archaeal 군집은 풍부한 species 인 Methanocorpusculum_uc (54.7 %), LNLC_g LNJC_s (Accession LNJC01000028; 16.5 %), Methanosaeta concilii (12.7 %), Methanomassiliicoccus_uc (7.3 %)의 특징을 보였다. 그러나 BER17에서는 Methanocorpusculum_uc (86.1 %)가 유난히 높았으며 L. LNJC_s (3.8 %)와 M. concilii (3.5 %)는 덜 풍부했다. 그러나 대조구의 archaeal 군집은 PC1에 비해 PC2와의 상관 관계가 높았고 L. LNJC_s (37.4 %), M. concilii (23.3 %), Methanomassiliicoccus_uc (15.1 %) 및 AF424768_g CU917078_s (Accession CU917078, 15.1 %)의 영향을 받았다. Methanocorpusculum spp.은 대조구에서 아주 흥미로웠다. Methanocorpusculum spp. 는 CO₂ 존재 하는 환경에서 H₂, formate 및 2-propanol 을 대사하는 수소이용메탄생성균이지만 acetate, 효모 추출물 및 tungstate과 같은 보충제를 포함한 영양제가 필요하다 (zellner et al., 1987). 그러나, 이전의 연구에서 Methanocorpusculum spp.는 생물전기화학 혐기성 소화조에서 지배적 인 archaeal species로 밝혀졌다 (Feng et al., 2018a). 전기장에 노출 된 BER17과 BER67의 Methanocorpusculum spp.의 풍부도는 그가 electrotrophic methanogens 임을 시사한다. Methanocorpusculum spp.는 BER17에서 상당히 풍부 하였지만(Fig. 4.6b) 석탄으로부터 메탄을 생성하는 데는 활발하지 못했다 (Fig. 4.2a). Methanocorpusculum spp.가 0.17 V / cm의 낮은 정전기장에서 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물을 활발하게 대사할 수는 없

지만 중간생성물의 독성을 견디는 데 도움이 될 수 있다. *M. concilii*는 acetoclastic methanogen으로 잘 알려져 있지만 생물전기화학 혐기성 소화조에서 DIET와 관련된 electrotrophic methanogen이기도하다 (Patel, 1984; Patel, 1990, Rotaru et al., 2014). 흥미롭게도, *M. concilii*의 풍부도는 BER17에서 상당히 낮았으며 석탄의 메탄전환율도 낮았다. 이는 *M. concilii*가 0.17 V / cm의 낮은 정전기장에서 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물을 대사할 수 없음을 나타낸다. *Methanomassiliicoccus* spp.는 *Methanomassiliicoccus luminyensis*와 *Methanomassiliicoccus intestinalis*를 포함하여 CO₂ 존재 하에서 에너지 원으로 수소와 메탄올을 사용하여 메탄을 생산하는 bacteria 이다 (Dridi et al., 2012; borrel et al., 2013). 최근에, *Methanomassiliicoccus*는 항생제를 분해하는 생물 전기 화학 반응기에서 발견되는 전기 영양 메탄생성 물질이라는 것이 밝혀졌다 (Zhang et al., 2017).

4.3.4 시사점

저등급 석탄에 함유된 탄화를 거치는 유기 물질은 혐기성 미생물에 의해 메탄으로 전환될 수 있다 (Fallgren et al., 2013; Harris et al., 2008). 석탄에 함유된 유기물질을 생물학적 방법으로 메탄으로 전환시키는 것은 지속 가능하고 환경친화적인 세계 에너지를 개발하는 접근법으로서 매우 매력적이다. 그러나 석탄에 함유된 유기물질은 리그닌과 같은 난분해성 물질로 구성되어 있으며 가수분해 과정에서 생체이용 가능성이 어려운 독성을 가진 방향족 및 지방족 화합물이 생성된다 (Zheng et al., 2017; Ritter et al., 2015). 이러한 중간생성물은 혐기성 미생물의 신진대사를 억제하여 석탄의 메탄전환을 저해하여(Piao et al., 2018) 석탄 1g의 생물학적 메탄발생량은 수십 마이크로리터에서 수 밀리리터만 큼 낮다(Fuertes et al., 2017; Bao et al., 2018). 최근 석탄의 메탄 수율은 생물 전기화학적 방법을 사용하여 현저하게 향상될 수 있음이 밝혀졌다 (Piao et al., 2018). 그러나 생물전기화학적 메탄생산에 사용되는 혐기성 미생물은 독성 중간생성물에 적응하는데 많은 시간을 필요로 하며, 메탄으로의 전환율은 현장에서 실행하기에는 너무 낮다. 본 연구에서, 우리는 0.67 V/cm의 정전기장이

exoelectrogenic bacteria와 electrotrophic methanogenic archaea를 포함하여 전기활성이라고 믿어지는 효모 추출물로 수정된 석탄 매체에서 발견된 미생물 species를 풍부하게 한다는 것을 발견했다. 풍부한 bacteria species은 Cloacamonas acidaminovorans, BBZD_g_uc 및 Porphyromonadaceae_uc이었고, archaeal species는 Methanocorpusculum spp., LNJG_g LNJG_s 및 Methanosaeta concillii이었다. 이 미생물 species은 효모 추출물로 수정된 석탄에서 즉시 메탄을 생산할 수 있다. 석탄으로부터의 즉각적인 메탄생성은 상업화에 중요한 의의를 지닌다. 그러나 메탄 생산은 중간생성물의 축적에 의해 서서히 억제되었고 (Orem et al., 2010; Piao et., 2018) 메탄 수율은 결국 25.1 mL / g lignite에서 포화되었다. 잔류 중간생성물의 상당 부분이 남아있는 생물전기화학 소화조에 효모 추출물과 혐기성 슬러지를 보충함으로써 중간생성물이 추가적으로 메탄으로 전환될 수 있음을 발견했다. 따라서 최종메탄생성량은 109.9 mL / g 갈탄에 도달했다. 이것은 우리에게 알려진 갈탄의 최대메탄전환량이다 (Zheng et al., 2017; Piao et., 2018). 그러나, 석탄의 생물학적 메탄전환은 아직 초기 단계에 있다. 이러한 새로운 발견을 현장에 적용하려면 효모 추출물보다 더 저렴한 생체자극 물질을 조사하고 정전기 장을 최적화하여 생물전기화학 혐기성 소화조에서 전기활성미생물 사이의 DIET를 더욱 촉진하여 증진시킬 필요가 있다.

4.4 결론

정전기장은 효모 추출물로 수정된 석탄의 혐기성 배지에서 미생물 종을 풍부하게 한다. 전기활성미생물 종은 Cloacamonas, BBZD_g, Porphyromonadaceae_uc, 그리고 Archaeal genera Methanocorpusculum, LNJG_g, Methanosaeta 및 Methanomassiliococcus를 포함한다. Exoelectrogens와 electrotrophs사이의 전기활성 종 사이의 직접중간전자전달은 전기장에 의해 촉진되어 지체기간 없이 석탄으로부터 메탄을 생성한다. 그러나 메탄생산은 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 축적에 의해 억제된다. 효모 추출물과 혐기성 슬러지를 보충하면 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로부터 메탄을 추가로 생산할 수 있으며 석탄의 총 메탄생성량은 109.9 mL/g lignite으로 우리가 아는 한 최대값이었다.

제 5 장 석탄의 생물전기화학적 메탄전환에 대한 물 전기분해의 영향

5.1 서론

대부분의 지하 석탄층에는 최소 두가지 유형의 화석연료 에너지인 석탄과 coalbed methane (CBM)이 포함되어 있다(Davies et al., 2018b). 석탄은 연소과정에 이산화탄소의 배출량이 높을 뿐만 아니라 천연가스과 비교할 때 약 450% 더 많은 질소산화물, 500% 많은 일산화탄소 및 400% 이상의 particulate 배출을 초래한다(U.S. Energy Information Administration, 2017a, 2017b). 반면에 천연가스의 주성분인 CBM은 석탄보다 청정한 에너지 자원으로 간주되며 에너지 함량에 비해 생성되는 수은이나 황화합물의 양은 무시할 만큼 극히 적고 이산화탄소의 배출은 석탄의 절반가량이다. CBM은 전 세계의 중요한 비전통적인 청정 에너지원으로 간주되며 1980년대 후반부터 미국에서 상업적으로 추출되었다(Strapoc et al., 2011).

현장외에서 메탄은 두 가지 방법으로 형성 될 수 있으며 한가지는 열화학적 전환으로 고온고압에서 에너지 소비를 동반하는 석탄의 가스화이며, 다른 한가지는 미생물의 대사작용에 의한 석탄의 생물학적 전환이며 낮은 온도 낮은 압력에서 환경친화적인 방법으로 전환되는 과정이다(Park and Liang, 2016; Ritter et al., 2015). 메탄은 석탄의 생물학적 메탄전환의 최종산물로서 매우 간단하지만 전반적인 전환과정은 복잡한 다단계과정을 거친다. 석탄은 일반적인 유기물질에 비해 혐기성 미생물에 의한 메탄으로의 전환에 이상적인 기질은 아니며 그 구조가 까다롭다(Colosimo et al., 2016). 석탄은 탄화가 완료되었거나 탄화가 진행 중인 고형물로서 석탄에 함유된 유기물은 주로 리그닌과 같이 소수성 물질들이다 (Colosimo et al., 2016; Senthamaraiikkannan et al., 2016; Strapoc et al., 2011). 석탄의 생물학적인 메탄전환과정에는 다양한 석탄의 분해반응들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 이러한 반응들은 extracellular enzymatic depolymerization, hydroxylation, carboxylation, methylation 및 methanogenesis

등을 포함한다 (Strapoc et al., 2011). 석탄의 메탄전환과정에서 생성되는 중간 생성물들은 대부분 미생물들이 이용하기 어려운 aromatic rings, polycyclic aromatic hydrocarbons, (PAHs), aromatic nitrogen compounds 및 aliphatics 과 같은 몇 가지 주요한 중간생성물이다(Haider et al. , 2013; Furmann et al., 2013). 석탄의 메탄전환에 관여하는 미생물은 이들 중간생성물들에 의한 독성에 의해 성장이 억제되어 메탄생성반응이 정상적으로 일어날 수 없었다 (Piao et al., 2018). 많은 연구에 따르면 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 축적은 석탄의 생물학적 메탄전환반응의 율속단계이다(Senthamaraiikkannan et al., 2016; Papendick et al., 2011; Huang et al. 2013). 그러므로, 혐기성 미생물에 의한 석탄의 메탄으로의 미생물 전환율은 매우 느리며, 메탄생성량도 너무 낮다. 최근 에, 에너지원으로서의 메탄에 대한 엄청난 경제적 및 환경적 관심으로 인하여, 현장에서 및 현장 외에서 미생물에 의해 생성되는 석탄의 메탄전환반응을 강화시키기 위하여 bioaugmentation, 석탄의 bioavailability 증가, biostimulation등의 전략들이 시도되어 왔다(Colosimo et al., 2016; Park and Liang, 2016; Ritter et al., 2015). bioaugmentation 는 석탄환경에 석탄의 가수분해와 산발효를 촉진하는 Bacteria와 메탄을 발효하는 Archaea를 추가하는 방법이다(Ghosh et al., 2014; Davis et al., 2018). bioavailability 증가하기 위한 석탄의 전처리는 석탄을 분쇄하여 입경을 감소시키거나, 공극율의 향상, 용해도를 증가시키고 계면활성제 주입하여 표면 및 계면 장력을 감소시키는 등의 방법이 이 범주에 속한다 (Colosimo et al., 2016; Zhang et al., 2016; Fuertez, et al., 2017; Davis et al., 2018). Biostimulation은 석탄 층에 부족한 질소, 인, 미량원소, 비타민과 같은 무기영양분을 주입하여 석탄 분해 미생물들의 성장을 촉진시키는 방법이다(Piao et al., 2018; Barnhart et al., 2013; Harris et al., 2008). 최근에는 석탄의 분해과정에 필요한 전자수용체를 공급하는 호기성 전처리방법도 연구되고 있다 (Wang et al., 2017). 하지만 1g의 석탄에서 얻을 수 있는 메탄 수율은 여전히 수십 μ L에서 수 mL이었다(Colosimo et al., 2016; Zhang et al., 2016; Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017). 결과적으로 혐기성미생물에 의한 메탄의 생성속도는 매우 느리며, 메탄의 생성 수율은 아직 현장에서 상업화하기 힘든 낮은 단계에 있다(Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017). 메탄을 상업적으로 이용하

기 위해서는 석탄의 메탄전환속도와 메탄 수율을 향상시키는 것이 중요하다. 생물전기화학 혐기성소화조에서는 혐기성분해반응의 한계로 여겨져 왔던 동력학적 및 열역학적인 한계들이 중간직접전자전달을 통한 메탄생성에 의해 상당히 완화될 수 있다(Song et al., 2004; Feng et al., 2016; Feng et al., 2018). 또한 방향족 화합물들은 전자수용체인 산소가 존재할 때 방향족 고리(aromatic ring)를 산화시키거나 방향족의 핵(aromatic nucleus)에 분자상태의 산소를 추가함으로써 ring이 opening되어 분해된다(Sharma, et al., 2016; Nzila, 2018).

본 연구에서는 생물전기화학 혐기성소화조에서 물의 전기분해에 의해 생성되는 산소가 방향족 화합물을 산화시키거나 방향족의 핵에 추가되어 ring opening을 자극함으로써 메탄 수율 향상에 대한 전자수용체로서의 산소의 영향을 조사하였다.

5.2 재료 및 방법

5.2.1 석탄, 효모 추출물 및 혐기성 슬러지

석탄의 메탄전환연구를 위하여 캐나다산 갈탄(Aquajiny Co., South Korea) 을 준비하였다. 이 갈탄은 VS/TS 28.5%, 0.52 g COD/g coal 이고 함수율이 18.4 % 이었다. 준비된 갈탄은 막자사발을 이용하여 분쇄하고 1 mm 체로 걸러 분말형태로 만들었으며, 105°C 에서 12시간 건조시켜 메탄전환 실험에 사용하였다(Piao et al., 2018). 혐기성 회분식 실험을 위한 배지는 초기농도가 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.45 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.58 g/L, NH_4Cl 0.31 g/L, 그리고 KCl 0.13 g/L, NaHCO_3 8.4g/L가 되도록 준비하였으며, 소량의 vitamins and trace metals 용액을 이전의 방법에 따라 추가하였다(Feng et al., 2018a). 또한 배지에 yeast extract powder (Becton Dickinson and Company; Sparks, MD21152 USA) 를 1.0g/L이 되도록 주입하였다. Sewage Treatment Plant (Busan, South Korea) 에서 수집한 혐기성 슬러지를 1 mm 체로 거른 후 4°C 냉장고에서 24시간 동안 침전시킨 후 식중균으로 사용하였다. 혐기성회분식실험에서 사용한 식중슬러지의 초기 특성은 pH가 7.30 이었으며, 알카리도와 VSS가 각각 3.96 g/L as CaCO_3 , 18.15 g/L 이었다. 추가 식중 시 사용한 슬러지의 초기 pH는 7.36 이었

으며 알칼리도와 VSS가 각각 4.14 g/L as CaCO₃, 17.5 g/L 이었다.

5.2.2 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조

Cylindrical acrylic resin을 이용하여 bioelectrochemical anaerobic batch reactor (effective volume 0.5L, diameter 8.5 cm, height 10 cm)를 제작하였다 (Fig.1). 회분식 반응조의 상부는 acrylic plate로 이루어진 cover를 flange joint하여 sealing함으로써 혐기성상태를 유지할 수 있도록 하였다. 반응조 내부에는 교반을 위한 blade를 설치하였다. 블레이드는 steel shaft를 이용하여 반응조 상부에 설치된 DC motor에 연결하였다. Acrylic cover에는 액체 및 가스 sampling ports 그리고 off-gas valve를 설치하였다. 시료 채취구와 가스채취구는 n-butyl bubber stopper로 각각 밀봉하였다. 액체시료 채취구 및 블레이드 축이 통과하는 상부덮개의 하단에는 외부공기의 유출입을 차단하기 위하여 액상에 잠기도록 연장된 sealing tube를 각각 부착하였다. off-gas valve는 고무관으로 부유식 가스수집기(floating type gas collector)와 연결하였다. 부유식 가스수집기의 내부에는 미생물의 번식과 발생한 가스의 재용해를 막기 위하여 황산과 NaCl로 산성화된 포화염수를 채웠다. 대면적(26 cm × 9 cm)과 소면적(6.5 cm × 7 cm)의 티타늄호일(0.1T, Grade2; Baoji HongYaDa Nonferrous Metal Materials Co., Ltd; Baoji, China)을 각각 준비한 뒤 대조용 티타늄 호일은 전극표면에서의 물의 전기분해를 막기 위해 유전물질(alkyd enamel, 470 g/L volatile organic compounds, Noroo Paint & Coatings Co., Anyang, Korea)을 이용하여 코팅하였다. 대면적 및 소면적 티타늄호일은 반응조 내벽과 블레이드 축 밀봉관의 외벽에 각각 환형으로 설치하고 티타늄선과 접속시킨 뒤 외부직류전원(ODA Technologies, CO., Incheon, South Korea)의 단자에 각각 연결하여 전극을 만들었다(Fig.5.1). 실험을 위하여 각각의 혐기성 회분식 반응조에 식종균 250mL과 yeast extract를 포함한 배지 250mL을 주입한 뒤 석탄의 초기 농도가 5g/L가 되도록 갈탄 2.5g을 주입하였다.

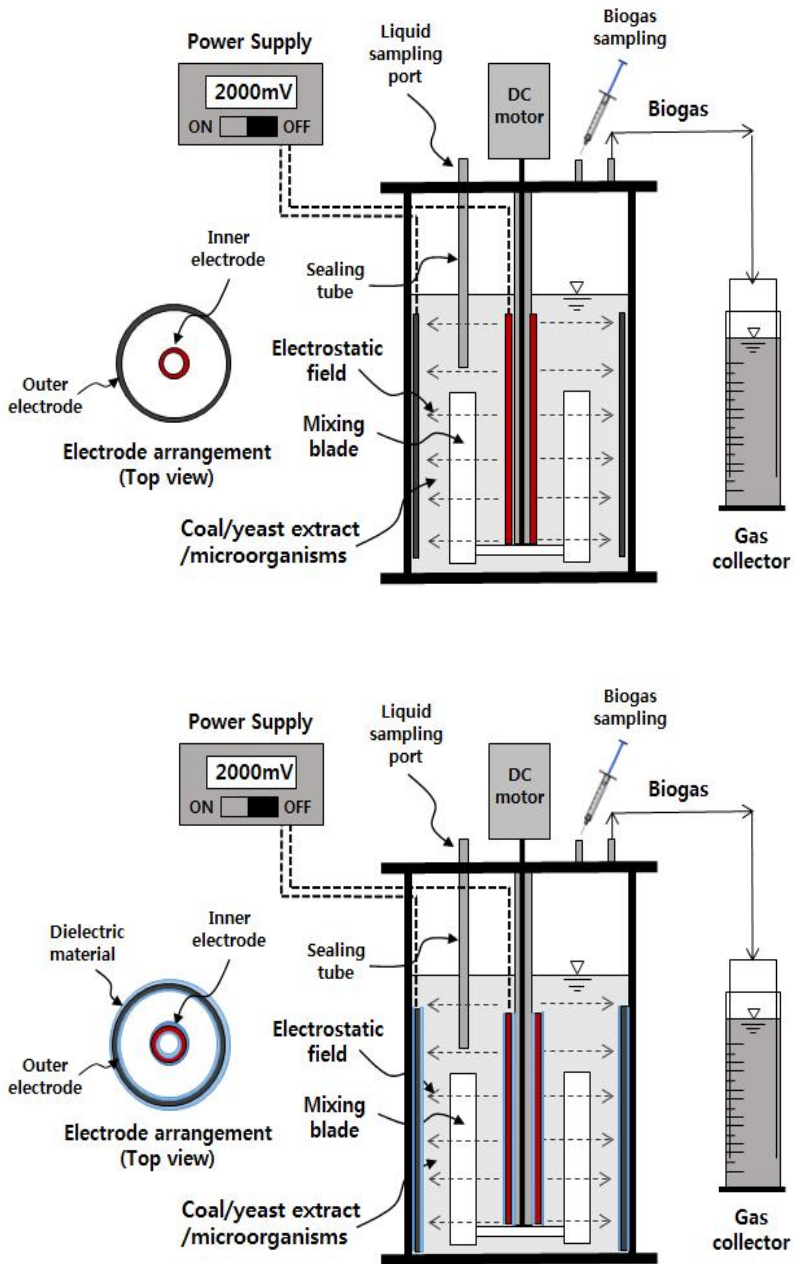


Fig. 5.1. Schematic diagram of the bioelectrochemical anaerobic batch reactor a) Non coated electrode and b) Coated electrode.

외부 직류전원을 이용하여 0.5V, 1.0V 및 2V의 전압을 전극 사이에 각각 인가하였다. 이들 혐기성 회분식 반응조는 각각 OE17, OE33 및 OE67로 명명하고 코팅된 전극으로 준비된 반응조는 2V의 전압을 인가하고 IE67로 명명하였다. 준비된 반응조들은 35℃의 항온실에 설치하였으며 DC 모터를 이용하여 블레이드를 약 120 rpm으로 회전시켜 교반하였다. 또한, 전압을 인가하지 않은 반응조를 별도로 준비하여 대조구로 사용하였으며, 식중슬러지에서 발생한 메탄발생량을 보정하기 위하여 석탄을 주입하지 않은 반응조를 동일한 조건에서 운전하였다. 생물전기화학 혐기성 소화조에서 바이오 가스 생산이 관찰되지 않을 때 250mL의 슬러지와 배지 및 효모추출물로 반응조내부의 벌크용액 250mL와 대체하였다.

5.2.3 DNA 추출 및 메생물 분석

생물전기화학 혐기성 회분식 실험에서 메탄의 생성이 더 이상 관측되지 않을 때 벌크 용액에서 16S rRNA 미생물 군집을 조사하기 위해 부유 슬러지를 채취하였다. DNeasy Power Soil Kit(MO BIO laboratories, Inc., CA, USA)를 사용하여 그의 Protocol에 따라 부유 슬러지로부터 Methagenomic DNA를 추출하고 Microbiome Taxonomic Profiling를 수행하였다. Fusion primer를 사용하여 Methagenomic DNA에서 16S rRNA 유전자의 가변 영역 (Bacteria의 경우 V3V4, Archaea의 경우 V1V9)을 증폭시켰다. 16S rRNA는 Methagenomic DNA로부터 증폭되고 MiSeq Personal Sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하여 Sequencing하였다. Sequencing 라이브러리의 구축 및 증폭, 생물 정보학 분석은 이전 연구를 따랐다 (Chun et al., 2010). Chimera는 EimTaxon 데이터베이스 (<http://www.ezbiocloud.net/>)에서 확인하고 미생물 군집과 통계 분류학적 할당 및 미생물 군은 OTU(Operational Taxonomic Units)를 사용하여 얻었다. EZ Biocloud (Chunlab, Inc., Seoul, Korea)는 미생물 종 분류, 클러스터 분석, 미생물 기원 추적, 계층적 클러스터링 및 종 다양성의 다양한 지표와 같은 포괄적인 미생물정보분석을 수행했다. Inter microbial community의 종 유사성은 R에서 factoextra package를 사용한 주성분 분석으로부터 얻어졌다.

5.2.4 분석 및 결과 해석

생물전기화학 혐기성 회분식 실험이 진행되는 동안 액체시료 채취구를 통하여 소량의 시료를 채취한 뒤 TS, VS, TCOD, SCOD, VSS 등의 물리화학적 특성변화를 모니터링하기 위하여 Standard Method에 따라 분석하였다(Eaton et al., 2005). pH는 pH 미터(YSI pH1200 laboratory pH meter 115-230V(T1))을 이용하여 측정하였다. 생물전기화학 혐기성 회분식 반응조에서 발생한 바이오가스의 메탄과 수소함량은 Porapak-Q 컬럼(6ft × 1/8 “, SS)과 TCD 검출기가 장착된 GC(Gas Chromatograph Clarus 580, PerkinElmer Co., Ltd.)를 이용하여 분석하였다. 생물전기화학 혐기성 회분식 반응조의 메탄생성량은 부유식 가스수집기에서 관측된 바이오가스발생량과 바이오가스의 메탄의 함량변화로부터 다음 식 5.1을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Equation 5.1: } V_{CH_4} = C_{CH_4}(V_{RH} + V_{GT} + V_{GC})$$

여기서, V_{CH_4} 는 메탄의 누적 생산량(mL)이며, C_{CH_4} 는 모니터링한 바이오 가스에서 메탄의 함량이다. V_{RH} 는 회분식 소화조의 헤드 스페이스 부피이며, V_{GT} 는 소화조와 가스 수집기 사이의 고무 튜브의 부피, V_{GC} 는 가스 수집기의 가스부분 부피이다. 생물전기화학 혐기성 회분식 실험에서 관측한 메탄발생량은 다음 식 5.2를 이용하여 수증기압과 온도를 보정함으로서 STP 상태로 전환시켰다.

$$\text{Equation 5.2: } V_{CH_4}(mL, STP) = V_{CH_4}(at T) \times \frac{273}{(273 + T)} \times \frac{(760 - W)}{760}$$

여기서, T는 운전온도인 35°C이며, W는 T°C에서의 수증기압(mmHg)이다.

회분식실험 종료직전 벌크용액에 대하여 cyclic voltammetry(CV) 실험을 수행하였다. 작업전극과 대전극은 각각 작은 스텐망 조각(1cm × 1cm)을 이용하였으며, Ag/AgCl 전극을 기준전극으로 사용하였다. CV 실험은 정전위장치(ZIVE SP1, WonA Tech, Korea)를 이용하여 1.0 V에서 1.0 V 까지 10 mV/sec 속도로 스캔하는 방법으로 진행하였다. Smart manager software (ZIVE BP2 Series,

WonATech, Kore)를 사용하여 cyclic voltammogram으로부터 redox 피크전위와 전류를 구하였다. 생물전기화학 혐기성 소화반응조에서 메탄생성이 더 관측되지 않을 때 액체시료를 채취하였다. 채취한 시료를 0.45 μm GF/C 멤브레인으로 여과한 후 DOC(용존유기탄소)가 1 mg/L로 되게끔 희석한 뒤 Spectrofluorophotometer (RF-6000 SHIMADZU; Wavelength: Excitation (Ex) 220~400nm/ Emission (Em) 250~600 nm)를 이용하여 Excitation emission matrix (EEM) spectra를 구하여 갈탄의 분해과정에서 생성된 중간생성물들을 분석하였다 (Chen et al., 2003).

5.3. 결과 및 토의

5.3.1 정전기장에서의 석탄의 메탄전환

OE67 (생물전기화학 혐기성 회분식반응조에 설치된 일반전극에 2V의 전압을 인가하여 벌크용액을 0.67 V/cm의 전기장에 노출시킨 반응조)에서 식중 직후 누적메탄발생량은 지체시간 없이 운전시간에 따라 급격하게 증가하여 4일째 145.6mL까지 생성되었다(Fig. 5.2). 이후 24일째까지 서서히 증가하면서 최종 누적메탄발생량은 165.0mL까지 도달하였다. IE67(생물전기화학 혐기성 회분식반응조에 설치된 절연전극에 2V의 전압을 인가하여 벌크용액을 0.67 V/cm의 전기장에 노출시킨 반응조)에서도 메탄은 지체시간 없이 급격하게 발생하였으나 4일째 119.4mL이었으며 최종 누적메탄발생량은 OE67반응조보다 적은 142.4mL이었다. 물의 전기분해에 필요한 전압은 1.48V로서 2V의 전압이 인가된 OE67 반응조의 전극표면에서 물의 전기분해가 진행되며 산화전극에서 산소가 생성된다. 생성된 산소는 전자수용체로서 석탄의 생물학적 메탄전환에서 분해되는 방향족 고리(aromatic ring)를 산화시키고 방향족의 핵(aromatic nucleus)에 추가되어 ring이 opening된다(Sharma, et al., 2016; Nzila, 2018). 이전 연구에서 과산화수소 및 과망간산칼륨 등 강산화제를 이용하여 전처리하는 방법으로 석탄의 가수분해를 자극하여 생물학적 메탄전환율을 증진시켰다(Huang et al., 2013a; Jones et al., 2013). 본 연구의 OE67반응조에서 생성된 산소는 전자수용체로서 방향족화합물의 개환을 자극하여 석탄의 메탄 수율을 향상시킨 것으로 사료된

다. 물의 전기분해에 필요한 전압보다 낮은 0.5V 및 1.0V의 전압이 인가된 OE17반응조 및 OE33반응조에서 생성된 메탄의 최종 발생량은 OE67반응조에서 생성된 메탄의 발생량보다 훨씬 적은 31.6mL 및 71.7mL이었다. 한편, 대조구의 메탄발생량은 OE17보다 많았지만 OE33보다 적은 47.6mL이었으며 공시료 소화조의 누적메탄발생량보다 적었다. 석탄의 혐기성분해과정에서 가수분해 및 산발효 과정에서 생성된 중간생성물질들은 혐기성 미생물에 독성이 있는 micromolecular acids, polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic compounds 그리고 phenols 등의 난분해 물질들이므로 알려지고 있다 (Piao et al., 2018; Nzila et al., 2018). 대조구의 식중 직후 누적메탄발생량이 공시료 소화조보다 작은 것은 메탄생성균의 활성이 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물들에 의해 저해되었기 때문이다. 식중초기의 급격한 메탄발생 이후 공시료 소화조에서는 기질의 고갈로 누적메탄발생량은 더 이상 증가하지 않았다. 그러나, OE67에서는 누적메탄발생량이 24일까지 지속적으로 증가하였고 IE67에서도 누적메탄발생량은 26일까지 시간경과에 따라 증가하였다. 이것은 OE67 및 IE67에서 석탄의 가수분해 및 산발효 산물의 메탄전환반응이 이루어 졌다는것을 나타낸다. OE67 및 IE67에서는 식중 직후 0.67 V/cm의 전기장에 의해 쉽게 분해 가능한 기질을 이용하여 메탄을 급격히 생산하는 과정에서 전기활성미생물이 풍부하게 된 것 같다. 또한, 쉽게 분해 가능한 물질이 소모되고 난 이후 풍부하게 된 전기활성균들 사이의 DIET 반응에 의하여 석탄의 가수분해 및 산발효 산물의 메탄전환 반응이 이루어 졌다는 것을 나타낸다 (Piao et al., 2018). OE17에서의 초기 누적메탄발생량이 대조구보다 작은 것은 석탄의 가수분해 및 산발효 반응이 전기장에 의해 좀 더 급격하게 진행되어 독성을 가진 중간생성물들이 좀 더 많이 축적되어 메탄생성이 억제되었기 때문이다. OE33에서도 마찬가지로 석탄의 가수분해 및 산발효 반응이 대조구에 비해 더 효과적으로 진행됨과 동시에 전기활성 메탄생성균들이 0.33 V/cm의 전기장에 의해 풍부해져 전기활성균들 사이에 DIET 반응이 이루어짐으로 인해 대조구보다는 메탄발생량이 많으나 석탄의 중간생성물의 축적에 따른 독성에 의해 메탄전환이 저해를 받은 것으로 사료된다. 흥미롭게도 메탄생성이 더 이상 관측되지 않았을 때 OE17, OE33, OE67 및 IE67의 잔류유기물의 SCOD는 모두 3000 mg/L이상이었다. 이것은 0.33

V/cm의 전기장이 석탄의 가수분해 및 산발효를 촉진하여 중간생성물은 축적시켰으나, 메탄생성을 위한 EB와 EMA사이의 DIET를 크게 촉진하지 못한 것으로 사료된다. 또한 메탄생성을 위한 EB와 EMA들의 대사과정이 축적된 가수분해 및 산발효 중간생성물들에 의해 크게 억제되었기 때문인 것으로 보인다.

29일째 IE67에 혐기성 슬러지와 효모 추출물을 보충하였을 때 누적 메탄생성량은 지체기 없이 다시 급격히 증가하여 613.8mL의 최대 값에 도달하였다 (Fig. 5.2). 이는 혐기성 슬러지 추가를 통한 생물증식과 효모 추출물의 추가를 통한 생체자극은 메탄전환에 관여하는 electrotrophic methanogens와 exoelectrogens에게 영양소와 쉽게 생분해 가능한 유기물을 공급하여 더욱 풍부하게 했으며, 이들 사이의 DIET를 촉진시켜 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로 이루어진 잔류유기물을 빠르게 분해하여 메탄을 생성시켰음을 나타낸다. 공시료 소화조를 통하여 효모 추출물 및 식종 슬러지에 함유된 유기물로부터 발생한 메탄발생량을 보정한 이후 IE67에서 석탄으로부터 발생한 메탄의 총수율은 121.0 mL/g lignite로 대단히 높았다 (Fig. 5.3). 이전 연구에서는 Yeast, algae 및 cyanobacteria와 같은 생물 추출물을 주입하거나, 호기성전처리 등의 방법으로 석탄의 메탄생성을 향상시킬 수 있었으나, 메탄 수율은 2.93 - 4.98 mL/g coal로 낮았다 (Davis et al., 2018). 석탄의 메탄 수율은 석탄의 종류에 따라서도 큰 차이를 보였는데 갈탄의 경우 최대 메탄 수율은 7.4 mL/g coal이었다 (Davis et al., 2018, Zheng et al., 2017). 그리고 우리가 아는 한 지금까지 보고된 석탄으로부터 전환된 메탄 수율의 최대 값은 생물전기화학소화조에서 얻은 54.5 mL/g lignite이었다 (Piao et al., 2018). 위의 결과는 석탄의 메탄전환반응은 전기장(0.67V/cm) 하에서 효모 추출물에 의해 석탄의 메탄전환에 관여하는 전기활성미생물의 풍부하게 함으로서 향상시킬 수 있으며, 효모 추출물과 식종슬러지를 보충하면 석탄의 가수분해 및 산발효 생성물로부터 추가적인 메탄생성이 가능하여 석탄의 메탄 수율을 극대화할 수 있음을 나타낸다. OE67에서도 메탄발생은 급격히 진행되어 누적메탄생산량이 389.7mL까지 도달하였으나 IE67보다는 적었다. OE67에서 일어나는 물의 전기분해는 초기단계에서 석탄의 개환반응에 전자수용체를 제공함으로써 가수분해를 촉진시켜 메탄전환에 적극적인 영향을 주었으나 전기활성 미생물의 DIET에는 전기장세기의 영향이 더 큰 것으

로 보인다. 한편, OE17, OE33 및 대조구에서는 초기 급격한 메탄생성 이후 시간에 따라 누적 메탄발생량이 점차 감소하는 경향을 보였다. 이러한 누적메탄발생량의 감소는 메탄을 산화하는 methanotrophs에 의한 것으로 보인다. Methanotrophs는 산소, 황산염, 질산염 등의 전자수용체가 존재하는 환경에서 다양한 종류의 alkanes, omatics, hyalogenated alkanes 등을 분해하는 능력을 가지는 것으로 알려지고 있다 (Wang et al., 2015, Gao et al., 2017). 그러나, 전자수용체가 없는 생물전기화학 혐기성 소화조에서도 Methanotrophs 균이 풍부해진다고 알려지고 있다(Paio et al., 2018). 또한 OE17과 OE33에서는 추가식종 후에도 메탄발생량이 대조구나 공시료 소화조보다 낮았다. 앞서 설명한바와 같이 낮은 전기장에서는 메탄생성을 위한 DIET를 크게 촉진하지 못하며 축적된 가수분해 및 산발효 중간생성물의 의해 메탄생성을 위한 전기활성균들의 대사 과정이 억제되는 것으로 보인다.

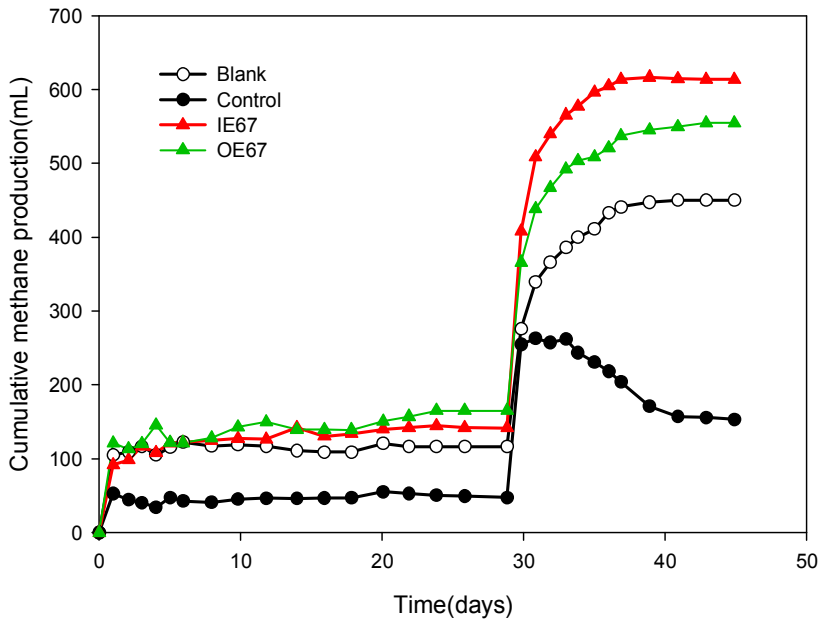


Fig. 5.2. Cumulative methane production from coal in Initial batch and Additional batch.

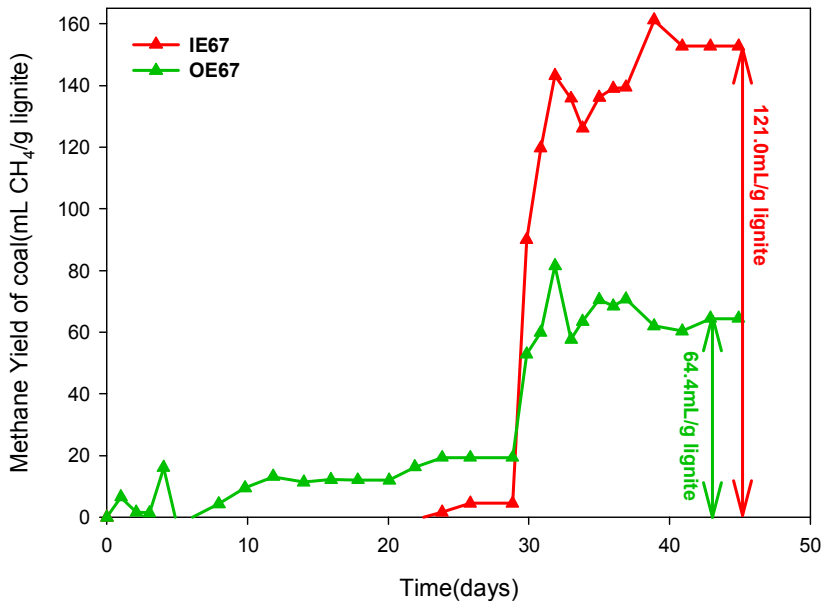


Fig. 5.3. Methane yield of coal in IE67 and OE67

5.3.2 생물전기화학적 석탄의 가수분해 및 발효

석탄의 가수분해 및 산발효 생성물의 생분해도와 메탄균에 대한 독성은 석탄의 메탄전환반응에 큰 영향을 미친다. 그러나 석탄의 메탄전환반응을 장시간 지속 하였을 때 대조구 및 IE67, OE17, OE33, OE67에서의 누적메탄발생량은 큰 차이를 보였다. 이것은 석탄으로부터의 메탄전환반응이 전기장의 세기와 가수분해 및 산발효 생성물의 축적에 크게 의존한다는 것을 나타낸다. 그러나, 메탄생성이 더 이상 관측되지 않았을 때 IE67, OE17, OE33, OE67에서 잔류 SCOD는 각각 3,782 mg/L, 3,580 mg/L, 3,499 mg/L, 3,479 mg/L이었으며, 이들 값은 대조구의 2,852 mg/L 보다 높았다(Table 5.1). 공시료 소화조에서 실험 초기에 급격하게 메탄이 발생하였지만 더 이상 메탄발생이 관측되지 않는 것은 효모 추출물에 함유된 유기물이 고갈되었다는 것을 나타낸다. 이것은, 대조구 및 IE67, OE17, OE33, OE67에서 반응초기 급격하게 발생한 누적메탄발생량이 공시료 소화조와 비슷한 것은 잔류 SCOD는 대부분 석탄의 가수분해 및 산발효산물임을

시사한다. 따라서, 대조구 및 IE67, OE17, OE33, OE67반응조의 잔류 SCOD는 각각 메탄생성반응을 저해하는 석탄의 가수분해 및 산발효 산물의 한계농도로 보인다.

Table 5.1 Methane conversion of coal in bioelectrochemical reactor exposed to an electrostatic field

Content		Control	IE67	OE17	OE33	OE67
Cumulative CH ₄ (mL)	Initial batch	47.6	142.4	31.6	88.8	165.0
	Additional batch	215.4	474.8	140.4	170.3	389.7
Total CH ₄ yield (mL/g lignite)	initial+additional		121.0			64.4
	End of initial batch	2851.7	3782.0	3579.8	3498.9	3478.7
SCOD(mg/L)	End of additional batch	1358.2	1015.8	2233.3	2034.9	1202.5

EEM 스펙트럼에서는 모든 반응조의 샘플이 III영역 (Em/Ex 400-525 nm / 220-250 nm) 과 V영역(Em/Ex 400-525 nm / 250-280 nm) 에서 강한 피크를 보였다(Fig. 5.4). 이 영역의 물질들은 fulvic acid, hydrophobic acid 및 humic acids 등을 포함하는 생물 이용성이 낮고 독성이 있는 난분해성 화합물질로서 이전 연구에서 보고된 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물질들과 유사한 물질들이다(Orem et al., 2010; Gosh et al., 2014; Wang et al., 2017). 또한, 석탄 가수분해 생성물들 중에서 방향족 화합물들이 메탄으로 전환되기 위해서는 carboxylation, hydroxylation, methylation 등의 반응을 통한 ring opening 과정을 거친 후 메탄의 전구물질인 초산, 수소 등으로 전환되어야 하는 것으로 알려지고 있다 (Nzila, 2018). 이것은 석탄의 가수분해반응에 의해 생성되는 hydrophobic, fulvic & humic acid like 화합물, 방향족 화합물들이 메탄전구물질로 발효되는 과정이 석탄으로부터 바이오 메탄생성 반응의 율속단계임을 시사

한다. IE67과 OE67에서는 대조구나 OE33과 달리 I 영역(Em/Ex 290-360 nm / 220-230 nm)에서도 상대적으로 강한 피크가 확인되었다. 이것은 메탄생성을 위한 SCOD의 한계농도가 대조구보다 높은 0.67 V/cm의 전기장에 의해 고분자 humic acids, fulvic acid등이 aromatic compounds로 발효된 것 같다. 메탄생성을 위한 DIET은 초산, 수소와 같은 중간생성물을 거치는 메탄생성반응(IIET)보다 독성물질이나 환경조건에 영향을 적게 받는 것으로 알려지고 있다 (Feng et al., 2018a; Yuan et al., 2011). IE67과 OE67의 SCOD의 한계농도가 높음에도 불구하고 메탄생성이 활발하게 진행된 이유는 EB와 EMA가 0.67 V/cm의 정전기장에 의해 enrich 되었고 전기활성균들의 DIET에 의해 메탄이 생성되었음을 시사한다. 혐기성 소화에서 유기물의 가수분해 동안, 지질, 탄수화물 및 단백질과 같은 불용성 유기 중합체는 먼저 가용성 단량체로 분해되며, 지방산, 아미노산 및 당류를 포함한 단량체 물질은 산성 박테리아에 의해 암모니아, 유기산, 수소 및 이산화탄소와 같은 유기 분자로 발효된다. OE33에서 I 영역(Em/Ex 290-360 nm / 220-230 nm)의 피크는 대조구에 비해 상대적으로 강한 한편 고분자 영역인 V 영역(Em/Ex 400-525 nm / 250-280 nm)에서의 피크는 대조구에 비해 약했다. 이것은 0.33V/cm의 전계강도에서 불용성 유기 중합체가 가용성 단량체로 분해되었다는 것을 나타낸다. 그럼에도 혐기성 슬러지와 효모 추출물을 보충한 후 OE33의 메탄전환율을 관찰해 보았을 때 대조구나 공시료 소화조보다 더 작았다. 이것은 0.33V/cm의 전계강도가 석탄의 가수분해는 촉진하여 중간생성물을 축적할 수 있으나 중간생성물의 독성을 극복하는 전기활성미생물을 풍부하게 하여 메탄생성을 위한 DIET에 기여하지 못한다는 것을 시사한다. 대조구에서는 EEM 스펙트럼이 250-600 nm / 220-400 nm (Em / Ex) 사이에 관찰되었고, 잔류 SCOD의 주성분은 fulvic acid과 humic acid-like substances로 확인되었다. 대조구에서 혐기성미생물들은 Fulvic acid 및 Humic acid like 성분들과 같은 석탄의 가수분해 및 산발효에 의해서 생성된 중간생성물들에 의해 메탄생성과 관련된 대사과정이 크게 저해를 받는다.

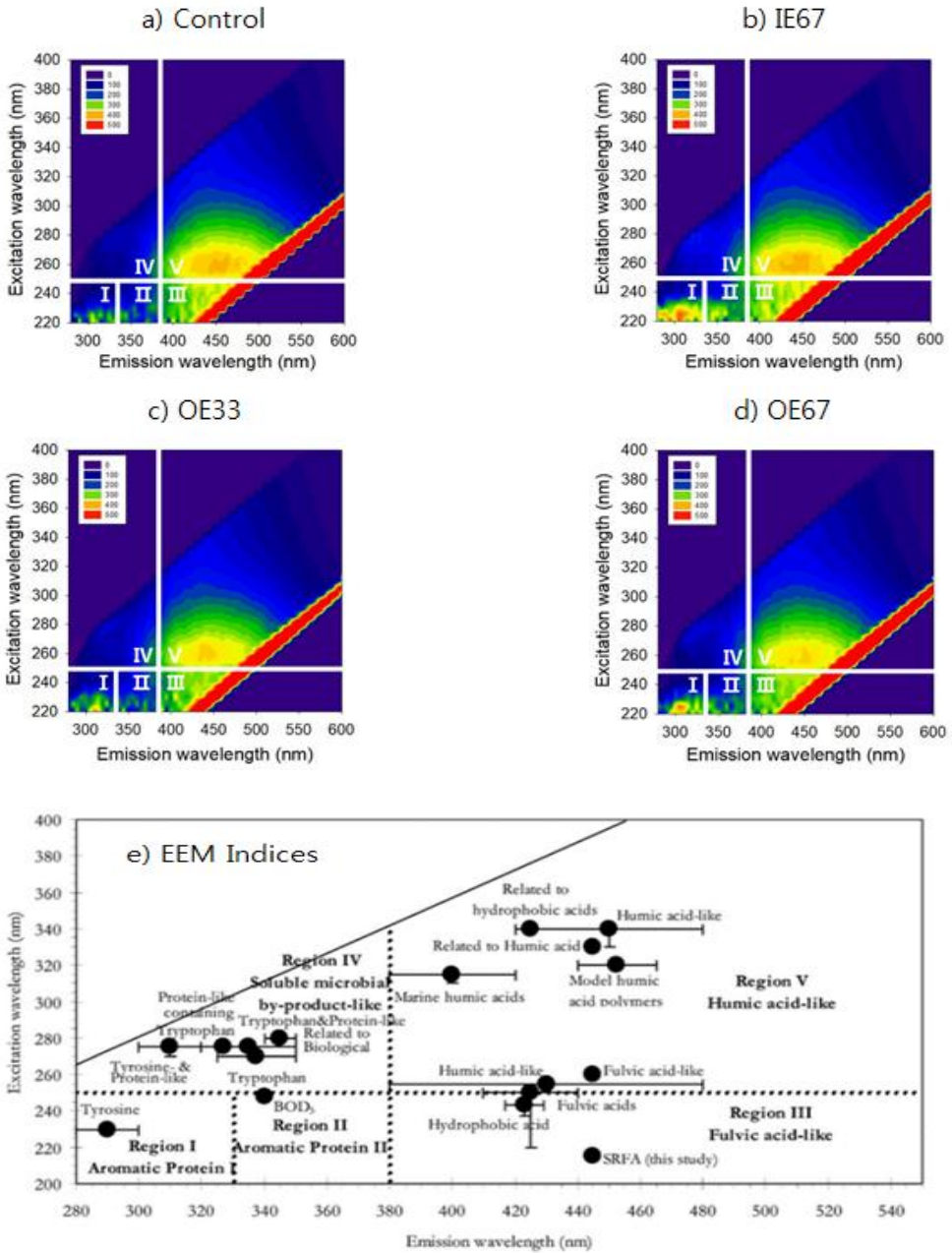


Fig. 5.4. Excitation Emission Matrix for hydrolyzed products a) Control, b) IE67, c) OE33, d) OE67 and e) EEM Indices.

5.3.3 정전기장에 노출 된 벌크용액의 Cyclic voltammogram

생물전기화학협기성소화조에서 벌크용액의 EFB 및 EMA를 포함한 벌크용액의 전기활성미생물은 Cyclic voltammogram 의 산화환원 피크에 의해 확인된다 (Feng et al., 2018, Harnisch et al., 2012). 생물전기화학반응조에서 관측되는 cyclic voltammogram (CV)의 redox peaks는 일반적으로 exoelectrogens, electrotroths 및 전자전달매개체들에 의해 생성되며, formal potential (E_f)은 전기활성미생물이나 전자전달매개체의 종류에 따라 $-0.43V \sim 0.5V$ vs Ag/AgCl 의 범위에서 다양하게 나타난다 (Lim et al., 2017; Feng et al., 2018). 흥미롭게도 IE67와 OE67의 CV 산화/환원 피크쌍은 각각 $-0.057V/-0.298V$ vs. Ag/AgCl ($E_f = -0.18V$)로 동일한 위치에서 관측되었다(Fig. 5.5). OE17 및 OE33에서도 E_f 는 각각 $-0.15V$ 및 $-0.19V$ 로 IE67이나 OE67에 비해 큰 차이가 없었다. 하지만 EFB, EMA를 포함하는 전기활성미생물의 활성을 반영하는 산화/환원 전류의 크기 ($I_{p,ox}/I_{p,red}(mA)$) (IE67: 0.51 / 0.44; OE67: 0.58 / 0.49; OE17: 0.40 / 0.23; OE33: 0.42 / 0.26)에는 큰 차이가 있었다(Table 5.2). 이것은 $0.67V/cm$ 의 전기장에서 메탄전환율이 높았던 결과와 일치하며 OE17과 OE33에서는 EFB와 EMA사이의 DIET가 상대적으로 메탄생성에 기여하지 못했으며 $0.67V/cm$ 의 전기장도는 $0.33V/cm$ 이나 $0.17V/cm$ 에 비해 메탄전환에 DIET를 촉진하는 전기활성 미생물을 풍부하게 하며 메탄생성을 크게 개선한다는 것을 시사한다. 한편 대조구의 산화/환원 피크는 $-0.018V/-0.417V$ vs. Ag/AgCl ($E_f=-0.22V$)로서 형식전위가 상대적으로 음의 값이었다. 이것은 대조구의 벌크용액에서 산화환원 피크에 관여하는 redox 물질들이 다른 반응조와 차이가 있다는 것을 나타낸다. 혐기성 소화조에서는 표준상태에서 산화환원전위가 $-0.4V$ vs Ag/AgCl 이하일 때 열역학적으로 이산화탄소가 환원되어 메탄이 생성될 수 있다 (Piao et al., 2018). 또한 대조구의 redox peak의 heights는 각각 $0.14mA$ 및 $0.10 mA$ 으로, OE17이나 OE33보다 작았다. 따라서, 대조구의 redox 물질들이 석탄의 메탄전환반응에서 DIET에 관여하였을 가능성은 낮다.

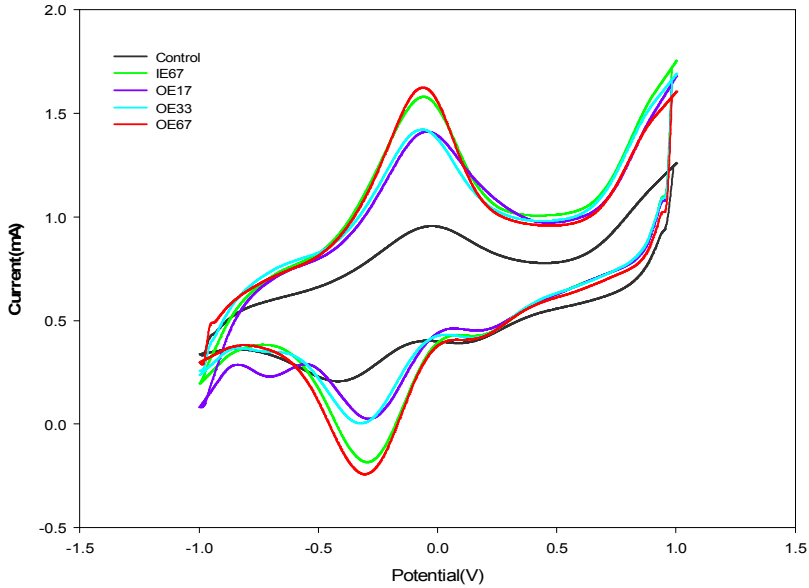


Fig. 5.5. Cyclic voltammogram in the initial batch experiment for the methane conversion of coal.

Table 5.2 Redox peaks in Cyclic voltammogram

Redox peaks in CV	Control	IE67	OE17	OE33	OE67
Ep,ox/Ep,red (VvsAg/AgCl)	-0.018 / -0.417	-0.057 / -0.298	-0.038 / -0.262	-0.058 / -0.317	-0.057 / -0.298
Ef(VvsAg/AgCl)	-0.218	-0.178	-0.15	-0.188	-0.178
Ip,ox/Ip,red(mA)	0.144 / 0.102	0.506 / 0.441	0.404 / 0.226	0.421 / 0.256	0.576 / 0.487

5.3.4 미생물군집

석탄의 메탄전환 실험 마지막에 생물전기화학반응조에서 벌크용액을 채취하여 미생물군집특성을 분석하였다. Bacteria community의 OTUs는 1597~1758종이었으며, Good's coverage of library는 99.6%이상이었다. Bacteria의 Valid reads는

33108~39035로 Total reads의 72.5-75.7%이었다. Archaeal community의 OTUs는 81~124종이었으며, Good's coverage of library는 100%에 달했다. Valid reads는 무려 85588~100047이었는데 이는 Total reads의 98.3-98.8%이었다. 미생물의 Valid reads를 볼 때 Bacteria군집은 Archaea군집의 40%에 불과했지만 OTUs는 15배~20배 정도로 높았으며, 풍부도(Jackknife indices)와 균등도(Shannon indices)로 평가한 종의 다양성이 상대적으로 높았다 (Table 5.3). Bacteria는 물의 전기분해가 일어난 OE67에서 종의 풍부도는 상대적으로 높았으나 균등도는 가장 낮았다. 이것은 OE67에서 석탄 가수분해물질의 발효에 관련된 박테리아의 특정종이 우점 성장하였다는 것을 나타낸다. 그러나, Archaea는 종의 풍부도와 다양성은 OE67에서 가장 높았고 IE67에서는 감소하였으며, OE33에서 가장 낮았다. 이것은 OE33에서는 DIET에 의한 메탄생성반응이 활성화되지 못하였다는 것을 나타내며, 그로 인해 축적된 가수분해 및 산발효 중간생성물의 독성에 의해 Archaea 종의 다양성이 낮아진 것 같다.

Table 5.3. Diversity indices for microbial species in bioelectrochemical anaerobic reactor

Diversity indices	Bacteria				Archaea			
	Control	IE67	OE33	OE67	Control	IE67	OE33	OE67
Total reads	45276	47009	48193	53413	101167	86869	101248	97722
Valid reads	33108	34081	36466	39035	99732	85588	100047	96058
Jackknife	1742	1783	1894	1850	112	100	92	132
Shannon	4.533	4.703	4.839	4.522	2.276	1.643	0.847	2.229
Good`s coverage of library(%)	99.6	99.6	99.6	99.6	100	100	100	100
OTUs	1597	1647	1758	1707	104	89	81	124
Valid Proportion(%)	73.12	72.50	75.67	73.08	98.58	98.53	98.81	98.30

Bacterial phylum은 모든 반응조에서 Bacteroidetes, Cloacamonas_p, Proteobacteria, Firmicutes순으로 우점하였다. Genus level에서 5% 이상 우점한 대조구의 속은 Cloacamonas, GQ396981_g, BBZD_g, 등이었다 (Fig.5.6a). 전기장에 노출된 IE67 및 OE33, OE67에서 genus 수준에서 우점한 속들은 대조구와 같았다. 그러나, OE67에서는 Thiopseudomonas의 풍부도가 다른 반응조에 비하여 배이상 증가하였다. Species 수준에서 주성분분석을 한 결과 군집의 특징을 보여주는 loading 벡터에서 OE67은 다른 반응조에 비해 PC1에 의해 상대적으로 큰 영향을 받았으나, OE33은 PC2에 의한 영향이 상대적으로 컸다(Fig.5.6b). 대조구와 IE67은 주성분분석의 loading 벡터에서 유사성을 나타낸다. Cloacamonas acidaminovorans 종은 모든 반응조에서 가장 우점하였으며 대조구에서 25.8%, OE67에서 23.7%, IE67에서 22.7%, OE33에서 20.9%로 모두 20%이

상을 차지하였다. 그외 대조구의 군집에 영향을 미치는 종은 GQ396981_g CU921187_s(5.0%), EU878324_g HQ183802_s(4.1%), AC160630_g CU924993_s(3.3%), DQ415754_g_uc(3.1%)순으로 풍부하였다. IE67의 군집에서도 GQ396981_g CU921187_s (5.7 %) 및 EU878324_g HQ183802_s (4.1 %), Porphyromonadaceae_uc(3.8%), AC160630_g CU924993_s(3.3%)가 풍부하였다. OE67의 군집에서는 Thiopseudomonas HQ183821_s(6.2%)로 다른 반응조보다 훨씬 많은 영향을 미친것으로 보여진다. 그외에 GQ396981_g CU921187_s (60%), EU878324_g HQ183802_s (3.9%), Porphyromonadaceae_uc (3.7%), BBZD_g_uc (3.3%), AC160630_g CU924993_s(3.1%)의 순으로 영향을 받았다. *C. acidaminovorans*는 아미노산을 발효시켜 탄소와 에너지를 획득하는 syntrophs이며, 생물전기화학반응조에서 자주 발견된다 (Feng et al., 2016; Pelletier E et al., 2008). *C. acidaminovorans*이 각 반응조에서 우점한 것은 각종 아미노산을 함유한 효모 추출물의 영향으로 보인다. OE67에서 풍부하게 존재하는 Thiopseudomonas HQ183821_s 는 주로 탈질 및 황화물을 제거하는 생물반응조에서 질산염을 전자수용체로 황화물을 제거하는 미생물계열의 종으로 알려지고 있다. Archaea에서는 OE67반응조의 군집과 대조구의 군집이 큰 유사성을 보였으며 IE67 및 OE33의 군집과 큰 차이를 보였다. Phylum level에서 Euryarchaeota는 대조구(95.4%), IE67(83.7%) 및 OE33(99.7%), OE67(90.7%)에서 모두 지배적인 우점군이였다. Genus level에서 대조구와 OE67의 Archaea 속은 IE67, OE33과 뚜렷한 차이를 보였다. 대조구 및 OE67에서는 Methanomassiliicoccus가 각각 27.3%, 30.5%로 가장 우점하였으나 Methanocorpusculum 및 Methanosaeta종들도 모두 20.1~22.6%로 세가지 종이 균등하였다. 그외 LNJC_g(11.1%, 6.9%), Methanoculleus(7.4%, 6.0%) 순으로 우점하였다. 반면 IE67 및 OE33에서는 Methanocorpusculum종이 각각 57.1%, 82.9%로 크게 우점하였다. 그외 Methanomassiliicoccus(14.6%, 7.2%), Methanosaeta(8.4%, 3.8%)로 풍부도가 크게 낮았다. (Fig.5.6b).

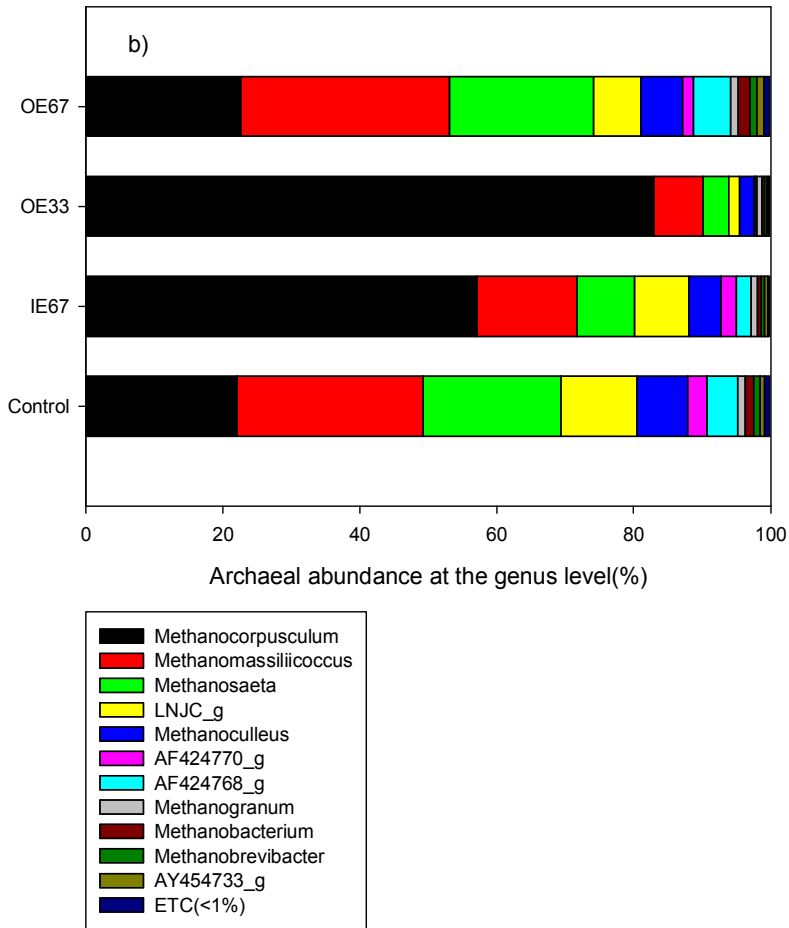


Fig. 5.6. Microbial abundance at the genus level: a) bacteria and b) archaea.

대조구와 OE67반응조는 은 PCA 분석에서 구한 loading vector를1 통해서 살펴 본 Archaea의 군집특성에서도 큰 유사성을 가지며 PC1나 PC2의 한쪽에 기울지 않고 균등한 상관관계를 보였다. 그러나, PC2에 대하여 IE67과 OE33은 음의 방향, 대조구와 OE67은 양의 방향으로 서로 상이한 관계를 보였으며 PC1에 대해서는 큰 상관관계를 나타냈다. Species level에서 대조구에서 가장 풍부한 종은 Methanomassiliicoccus_uc (27.2%)이었으며, Methanocorpusculum_uc (22.0%)가 우점하였고 그외에 Methanomassiliicoccus_u LNJG_g LNJG_s (11.0%),

Methanosaeta concilii(8.6%), Methanosaeta CU917101_s (6.5%), Methanoculleus receptaculi(5.5%)순으로 영향을 받는 것으로 평가되었다. 그러나, OE67의 Archaea 군집은 Methanomassiliococcus_uc(30.4%)가 가장 우점하였으며, Methanocorpusculum_uc (22.6%)가 제법 큰 영향을 끼치는 것으로 확인된다. 다음으로는 M. consilii (11.4%), L. LNJC_s (6.9%), M. CU917101_s (5.8%)가 풍부하였다. OE33에서는 Methanocorpusculum_uc (82.8%)의 풍부도가 크게 높았으며, Methanomassiliococcus_uc (7.1%)가 풍부하였다. IE67의 Archaea 군집은 Methanocorpusculum_uc (57.0%)의 풍부도가 가장 높았으며 Methanomassiliococcus_uc (14.6%), L. LNJC_s (7.9%)가 풍부하였다. Methanocorpusculum spp.은 37°C의 최적온도에서 성장하며 Acetate, yeast extract and tungstate을 영양분으로 하는 종으로서 CO₂가 존재하는 환경에서 H₂, formate and 2-propanol을 발효시키는 수소이용메탄균이다 (Zellner et al., 1987). 그러나, Methanocorpusculum은 벌크용액이 전기장에 노출된 IE67, OE33에서 크게 우점하는 것으로 보아 전자영양메탄균인 것으로 보인다. Methanocorpusculum은 이전 연구에서 생물전기화학소화조에서 우점한 속이었다 (Feng et al., 2018). 또한, OE33에서 풍부도가 IE67이나 OE67보다 높은 것은 Methanocorpusculum spp.은 다른 메탄생성균들에 비하여 상대적으로 석탄가수분해 및 산발효 중간생성물의 독성에 견디는 내성이 강한 것 같다. M. concilii는 혐기성 소화조에서는 초산이용메탄균이지만 생물전기화학반응조에서는 DIET에 관여하는 전자영양메탄균이다 (Patel GB et al., 1990; Patel GB, 1984; Huser BA et al., 1982; Rotaru et al., 2014). 그러나, M. concilii의 풍부도가 OE33에서 낮은 것으로 보아 상대적으로 독성물질에 대한 내성이 약하거나 전기장의 세기가 작을 때 DIET에 의한 메탄생성을 하기 어려운 종일 수 있다. 분류되지않은 Methanomassiliococcus_uc는 아직 밝혀지지 않았지만 Methanomassiliococcus luminyensis와 Methanomassiliococcus intestinalis와 같이 CO₂가 존재하는 환경에서 수소와 메탄놀을 에너지원으로 메탄을 생성하는 속일 가능성이 높다(Dridi B et al., 2012; Borrel G et al., 2013). 그러나, Methanomassiliococcus는 antibiotic를 분해하는 bioelectrochemical reactor에서 발견되는 전자영양메탄균이다(Zhang et al., 2017).

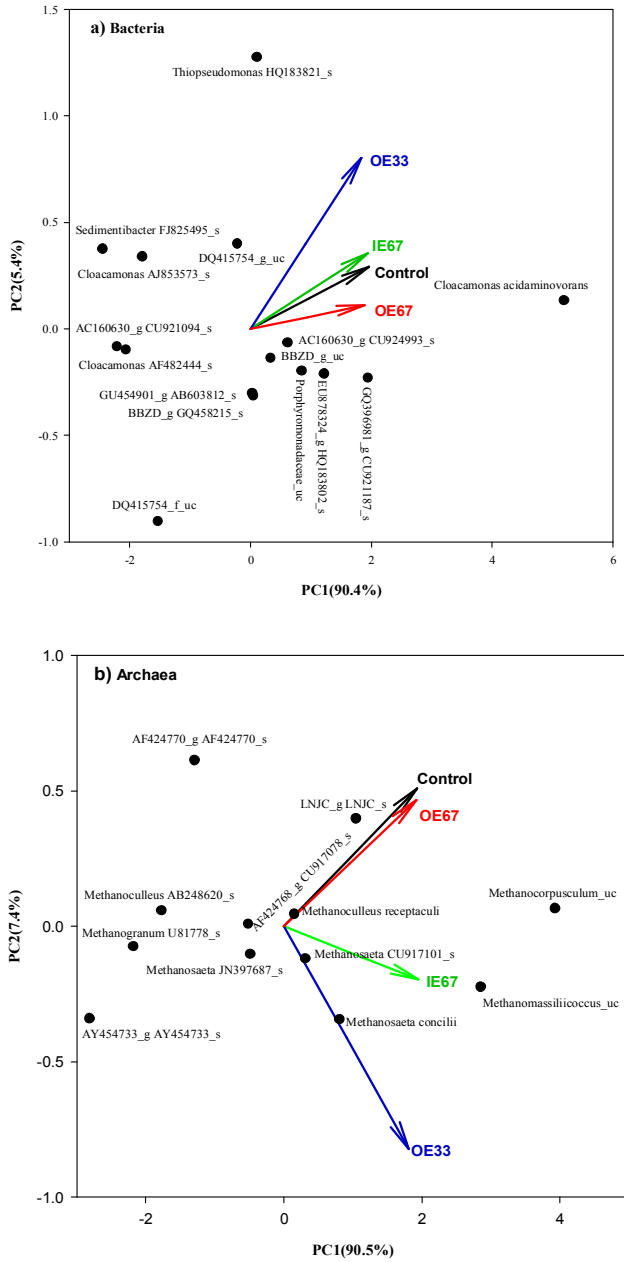


Fig.5.7. Biplot for the microbial species communities in the bulk solution: a) bacteria, b) archaea

5.3.5. 시사점

메탄은 청정에너지원으로서 각광받는 천연가스의 주성분이다. 석탄의 생물전기 화학 혐기성 메탄전환은 재래식 연소에 의한 오염물질을 줄이고 안정적이고 환경친화적인 에너지 자원을 확보하는데 중요하다. 지금까지 석탄의 생물학적인 메탄전환을 촉진시키기 위하여 많은 방법들이 시도되어 왔지만 지금까지 석탄에서 전환되는 메탄 수율은 상업화 되기엔 너무 낮았다(Zhang et al., 2016; Yi et al., 2017; Zheng et al., 2017; Davis et al., 2018; Song et al., 2016). 석탄에 함유된 유기물질은 복잡한 구조의 다환 방향족화합물로서 가수분해되어 생성되는 중간산물은 혐기성미생물의 메탄전환에 저해작용을 한다(Piao et al., 2018). 생물전기화학 혐기성소화조에 일반전극쌍을 설치하고 2V의 전압을 인가하여 벌크용액을 전기분해시킴으로 산화전극에 전자수용체인 산소를 생성시켰다. 방향족 화합물들은 전자수용체인 산소가 존재할 때 방향족 고리(aromatic ring)를 산화시키거나 방향족의 핵(aromatic nucleus)에 분자상태의 산소를 추가함으로써 ring이 opening되어 분해된다(Sharma, et al., 2016; Nzila, 2018). 결과 석탄의 메탄발생량이 165.0 mL로 IE67(절연전극에 2V의 전압을 인가)에서 발생된 142.8 mL보다 훨씬 많았다. 하지만 반응조의 벌크용액에 효모 추출물과 혐기성 슬러지를 보충하였을 때 추가로 생성된 석탄의 메탄수율은 OE67에서 45.0 mL/g lignite이었지만 IE67에서는 111.0 mL/g lignite로 증가되었다. OE67에서의 총 메탄수율은 64.4 mL/g lignite이었지만 IE67에서의 총 메탄수율은 121.0 mL/g lignite이었다. OE67에서 물의 전기분해에 의한 산소의 생성은 초기단계에서만 메탄전환을 개선했다. 석탄의 가수분해 대한 전자수용체인 산소의 동력학적 및 열역학적 작용은 심층 연구해 볼 필요가 있다.

5.4. 결론

생물전기화학혐기성소화조에서 정전기장은 석탄의 메탄 전환을 향상시키기 위해 전기활성을 가진 EFB와 EMA사이의 직접적인 중간 전자 이동을 촉진한다. 그리고 물의 전기분해에 의한 산소는 전자수용체로서 석탄의 가수분해 중간생성물의 개환반응을 자극하고 초기 단계에서 석탄의 메탄전환을 개선한다. 생물 증식 및 생체자극, 독성물질의 희석은 물의 전기분해가 없는 0.67V/cm 의 정전기장에 노출된 벌크용액에서 메탄전환율은 121.0 mL/g linite로 지금까지 알려진 최대의 수율이었다.

제 6 장 석탄의 생물전기화학적 메탄전환에 대한 활성탄의 영향

6.1 서론

세계 화석연료의 70%나 차지하는 석탄은 연소하는 과정에 분진과 이산화탄소, 황산화물, 질소산화물과 같은 오염물질을 다량 방출한다 (Dmitrienko et al., 2017; Ryu et al., 1993; Yi et al., 2017). 한편 세계의 주요 에너지 자원의 하나인 천연가스는 이용 시 독성이 없고 먼지나 재를 배출하지 않을 뿐만 아니라 석탄이나 석유 목재보다 CO₂를 적게 방출한다 (U.S. Energy Information Administration, 2017a, 2017b). 따라서 세계 에너지 자원의 패러다임은 현재의 전통 에너지 자원인 석탄, 석유로부터 비전통 가스에너지 자원인 셰일가스, 치밀가스, CBM(coalbed methane), 가스하이드레이트로 이행되고 있다 (Kim, 2015). 자원이 풍부하지만 오염물질을 많이 방출하는 석탄을 친환경적인 메탄으로 전환시키는 것은 안전하고 지속적인 에너지자원을 확보하기 위한 아주 매력적인 일이다. 석탄의 메탄전환은 열화학적 및 생물학적으로 이루어질 수 있다. 석탄의 열화학적 메탄전환은 고온고압에서 이루어지기 때문에 에너지 사용량이 높고 오염물질인 다양한 부산물들을 다량 발생시킨다는 단점이 있다 (Park and Liang, 2016). 석탄의 생물학적 메탄전환은 혐기성 미생물에 의해 이루어지는데 상대적으로 낮은 온도, 낮은 압력의 온화한 조건에서 이루어지기 때문에 환경 친화적이다 (Park and Liang, 2016; Ritter et al., 2015). 그러나, 생물학적인 석탄의 메탄전환은 속도가 대단히 느리고, 메탄전환율이 낮아 경제성이 없었다. 하여 지금까지 석탄의 생물학적인 메탄전환반응을 향상시키기 위하여 다양한 방법들이 시도되었다 (Zhang et al., 2016a; Fuertez, et al., 2017; Davis et al., 2018). 그러나 1g의 석탄에서 얻을 수 있는 메탄 수율은 석탄의 종류에 의존하지만 여전히 수십 μ L에서 수 mL에 불과하였다 (Bao et al., 2016; Zheng et al., 2017; Wang et al., 2017; Fuertez, et al., 2017). 석탄은 탄화가 완료되었거나 탄화가 진행 중인 고형물로서 석탄에 함유된 (메탄으로 전환 가능한) 유기

물은 주로 리그닌과 같이 소수성 물질들이다 (Colosimo et al., 2016; Senthamaraikkannan et al., 2016; Strapoc et al., 2011). 따라서, 석탄은 혐기성 미생물에 의해 메탄으로의 전환이 어려운 물질이다. 석탄의 생물학적 메탄전환을 강화하기 위한 전략은 bioavailability 향상, bioaugmentation, biostimulation 등 세가지 방법이 일반적인 범주에 속한다. 석탄의 bioavailability를 향상시키기 위하여 석탄을 분쇄하여 입경을 감소시키는 방법, 공극율을 높이는 방법, 계면활성제를 주입하는 방법들이 연구되어 왔다 (Zhang et al., 2016a; Fuertez, et al., 2017; Davis et al., 2018). 석탄의 생물학적인 메탄전환과정에는 다양한 석탄의 분해반응들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있다. 이러한 반응들은 extracellular enzymatic depolymerization, hydroxylation, carboxylation, methylation 및 methanogenesis 등을 포함한다 (Strapoc et al., 2011). 석탄의 메탄전환과정에서 생성되는 중간생성물들은 대부분 미생물들이 이용하기 어려운 다환 방향 탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), 방향족 질소 화합물 및 지방족 화합물과 같은 화합물들이다 (Orem et al., 2010; Zheng et al., 2017; Nzila, 2018). 석탄의 메탄전환에 관여하는 미생물은 이들 중간생성물들에 의한 독성에 의해 성장이 억제되어 메탄생성반응이 정상적으로 일어날 수 없었다 (Piao et al., 2018). 따라서, 석탄분해 과정에 생성되는 중간생성물들의 분해와 높은 메탄생성 활성을 가지는 미생물을 주입하는 bioaugmentation 등의 방법들이 시도되어 왔다(Ghosh et al., 2014; Davis et al., 2018). 최근에는 석탄의 분해과정에 필요한 전자수용체를 공급하는 호기성 전처리방법도 연구되고 있다 (Wang et al., 2017). 또한, 석탄은 미생물의 성장에 필요한 질소, 인, 미량원소, 비타민과 같은 무기영양분이 결핍된 물질이다. 따라서, 질소, 인과 같은 영양분을 주입하여 혐기성미생물의 성장과 활성을 촉진시키는 biostimulation 방법들이 석탄의 메탄전환효율을 향상시킬 수 있었다 (Zhang & Liang 2017; Zhang et al., 2018). 특히, 다양한 영양분을 함유하고 있는 효모 추출물은 석탄의 메탄전환율을 향상시키는데 도움이 되었다. 그러나, 상업적으로 경제성을 가지기에는 너무 낮았다 (Zhang & Liang 2017; Zhang et al., 2018).

최근 생물전기화학반응조를 이용하면 주목받을 만큼 석탄의 메탄전환율을 크게 향상시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다 (Piao et al., 2018). 생물전기화학반응조에는

전기활성균 (체외전자방출균과 전자영양메탄균)이 우점성장하고 이들 사이에 direct interspecies electron transfer (DIET)에 의해 메탄이 발생한다. 전기활성균은 cytochrome C를 세포외벽까지 확장시켜 전자를 외부로 직접전달하거나 외부에서 전자를 직접 받는 균이다 (Feng et al., 2018; Piao et al., 2018). 혐기성소화조에서 유기물이 발효되어 초산이나 수소와 같은 중간생성물을 생성하고 이들이 최종생성물인 메탄으로 전환되는 IIET에 비하여 DIET에 의한 메탄생성은 동력학적으로 그리고 열역학적으로 유리하다 (Song et al., 2004; Feng et al., 2016; Feng et al., 2018). 최근 보고에 의하면 생물전기화학반응조에서 미생물군집의 DIET를 향상시키는 방법으로 석탄의 메탄 수율은 54.5ml/g coal 까지 증가시킬 수 있었다(Piao et al., 2018).

흥미롭게도 전도성 물질은 메탄 생산을 향상시키기 위한 EFB와 EMA 사이의 DIET를 위한 도관 역할을 한다 (Kato et al., 2012; Shen et al., 2016). 이는 혐기성 소화에서 메탄생성이 전도성 물질의 첨가에 의해 쉽게 개선될 수 있음을 나타낸다.

본 연구에서는 분극 전극이 설치된 생물전기화학 혐기성소화조에 활성탄을 첨가하여 석탄의 생물학적 메탄전환을 극대화하기 위한 미생물 사이의 DIET에 대한 활성탄의 매개체 영향을 조사하였다.

6.2. 재료 및 방법

6.2.1 석탄, 효모 추출물 및 혐기성 슬러지

석탄의 메탄전환연구를 위하여 캐나다산 갈탄(Aquajiny Co., South Korea) 을 준비하였다. 이 갈탄은 VS/TS 28.5%, 0.52 g COD/g coal 이고 함수율이 18.4 % 이었다. 준비된 갈탄은 막자사발을 이용하여 분쇄하고 1 mm 체로 걸러 분말형태로 만들었으며, 105°C 에서 12시간 건조시켜 메탄전환 실험에 사용하였다 (Piao et al., 2018). 혐기성 회분식 실험을 위한 배지는 초기농도가 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.45 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.58 g/L, NH_4Cl 0.31 g/L, 그리고 KCl 0.13 g/L, NaHCO_3 8.4g/L가 되도록 준비하였으며, 소량의 vitamins and trace metals 용액을 이전의 방법에 따라 추가하였다(Feng et al., 2018a). 또한 배지에

yeast extract powder (Becton Dickinson and Company; Sparks, MD21152 USA) 를 1.0g/L이 되도록 주입하였다. Sewage Treatment Plant (Busan, South Korea) 에서 수집한 혐기성 슬러지를 1 mm 체로 거른 후 4°C 냉장고에서 24시간 동안 침전시킨 후 식중균으로 사용하였다. 혐기성회분식실험에서 사용한 식중슬러지의 초기 특성은 pH가 7.27 이었으며, 알칼리도와 VSS가 각각 3.65 g/L as CaCO₃, 16.5g/L 이었다. 추가 식중 시 사용한 슬러지의 초기 pH는 7.31 이었으며 알칼리도와 VSS가 각각 3.68 g/L as CaCO₃, 16.2g/L 이었다.

6.2.2 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조

Cylindrical acrylic resin을 이용하여 bioelectrochemical anaerobic batch reactor (effective volume 0.5L, diameter 8.5 cm, height 10 cm)를 제작하였다 (Fig. 6.1). 회분식 반응조의 상부는 acrylic plate로 이루어진 cover를 flange joint하여 sealing함으로서 혐기성상태를 유지할 수 있도록 하였다. 반응조 내부에는 교반을 위한 blade를 설치하였다. 블레이드는 steel shaft를 이용하여 반응조 상부에 설치된 DC motor에 연결하였다. Acrylic cover에는 액체 및 가스 sampling ports 그리고 off-gas valve를 설치하였다. 시료 채취구와 가스 채취구는 n-butyl bubber stopper로 각각 밀봉하였다. 액체 시료 채취구 및 블레이드 축이 통과하는 상부덮개의 하단에는 외부 공기의 유출입을 차단하기 위하여 액상에 잠기도록 연장된 sealing tube를 각각 부착하였다. off-gas valve는 고무관으로 부유식 가스수집기(floating type gas collector)와 연결하였다. 부유식 가스수집기의 내부에는 미생물의 번식과 발생한 가스의 재용해를 막기 위하여 황산과 NaCl로 산성화된 포화염수를 채웠다. 대면적(26 cm × 9 cm)과 소면적(6.5 cm × 7 cm)의 티타늄호일(0.1T, Grade2; Baoji HongYaDa Nonferrous Metal Materials Co., Ltd; Baoji, China)을 각각 준비한 뒤 전극 표면에서의 물의 전기분해를 막기 위해 유전물질(G2140, Printec Co., Ltd; Daegu, Korea)을 이용하여 코팅하였다. 대면적 및 소면적 티타늄호일은 반응조 내벽과 블레이드 축 밀봉관의 외벽에 각각 환형으로 설치하고 티타늄선과 접속시킨 뒤 외부직류전원(ODA Technologies, CO., Incheon, South Korea)의 단자에 각각 연결하여 전극

을 만들었다. 실험을 위하여 각각의 혐기성 회분식 반응조에 식중균 250mL과 yeast extract(1.0 g/L) 및 활성탄분말(3.0 g/L)을 포함한 배지 250 mL을 주입한 뒤 석탄의 초기 농도가 5 g/L가 되도록 갈탄 2.5g을 주입하였다.

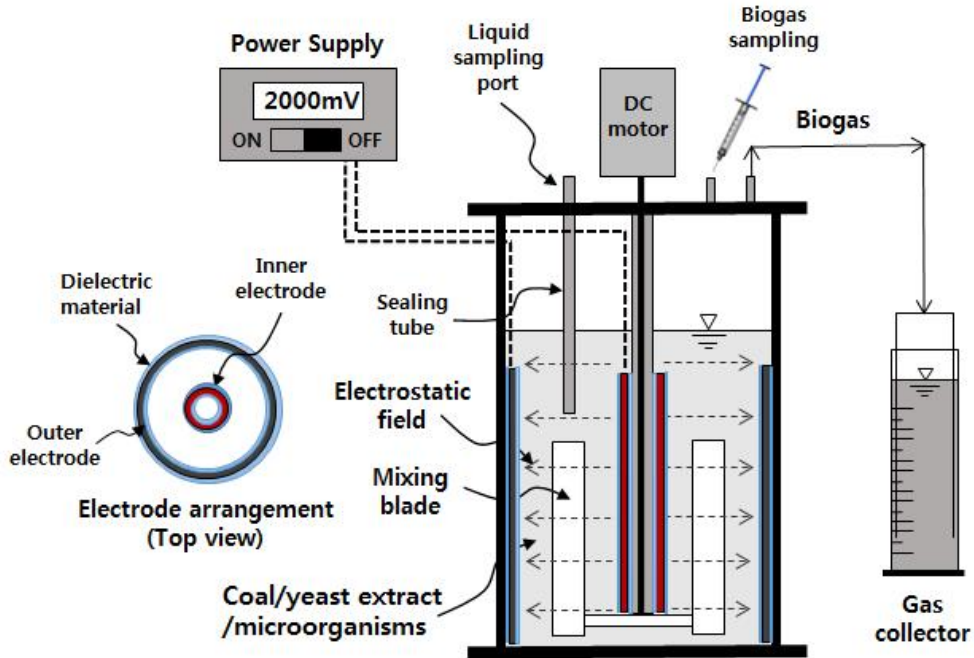


Fig. 6.1. Schematic diagram of the bioelectrochemical anaerobic batch reactor

외부 직류전원을 이용하여 0.5V, 1.0V 및 2V의 전압을 전극 사이에 각각 인가하였다. 이들 혐기성 회분식 반응조는 각각 AE17, AE33 및 AE67로 명명하였다. 또한, 전압을 인가하지 않은 반응조를 준비하여 AE00로 명명하였다. 준비된 반응조들은 35°C의 항온실에 설치하였으며 DC 모터를 이용하여 블레이드를 약 120 rpm으로 회전시켜 교반하였다. 그리고, 활성탄을 주입하지 않은 반응조를 별도로 준비하여 대조구로 사용하였으며, 식중슬러지에서 발생한 메탄발생량을 보정하기 위하여 석탄을 주입하지 않은 반응조를 동일한 조건에서 운전하였다. 생물전기화학 혐기성 소화조에서 바이오 가스 생산이 관찰되지 않을 때 각 반응조에서 250mL의 원액을 취하고 슬러지와 배지, 효모 추출물, 그리고 활성탄

이 원래의 농도로 구성된 접종물 250mL를 보충하여 운전하였다.

6.2.3 DNA 추출 및 미생물 분석

생물전기화학 혐기성 회분식 실험에서 메탄의 생성이 더 이상 관측되지 않을 때 벌크 용액에서 16S rRNA 미생물 군집을 조사하기 위해 부유 슬러지를 채취하였다. DNeasy Power Soil Kit(MO BIO laboratories, Inc., CA, USA)를 사용하여 그의 Protocol에 따라 부유 슬러지로부터 Methagenomic DNA를 추출하고 Microbiome Taxonomic Profiling를 수행하였다. Fusion primer를 사용하여 Methagenomic DNA에서 16S rRNA 유전자의 가변 영역 (Bacteria의 경우 V3V4, Archaea의 경우 V1V9)을 증폭시켰다. 16S rRNA는 Methagenomic DNA로부터 증폭되고 MiSeq Personal Sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하여 Sequencing하였다. Sequencing 라이브러리의 구축 및 증폭, 생물 정보학 분석은 이전 연구를 따랐다 (Chun et al., 2010). Chimera는 EimTaxon 데이터베이스 (<http://www.ezbiocloud.net/>) 에서 확인하고 미생물 군집과 통계 분류학적 할당 및 미생물 군은 OTU(Operational Taxonomic Units)를 사용하여 얻었다. EZ Biocloud (Chunlab, Inc., Seoul, Korea)는 미생물 종 분류, 클러스터 분석, 미생물 기원 추적, 계층적 클러스터링 및 종 다양성의 다양한 지표와 같은 포괄적인 미생물정보분석을 수행했다. Inter microbial community의 종 유사성은 R에서 factoextra package를 사용한 주성분 분석으로부터 얻어졌다.

6.2.4 분석 및 결과 해석

생물전기화학 혐기성 회분식 실험이 진행되는 동안 액체시료 채취구를 통하여 소량의 시료를 채취한 뒤 TS, VS, TCOD, SCOD, VSS 등의 물리화학적 특성변화를 모니터링하기 위하여 Standard Method에 따라 분석하였다(Eaton et al., 2005). pH는 pH 미터(YSI pH1200 laboratory pH meter 115-230V(T1))를 이용하여 측정하였다. 생물전기화학 혐기성회분식 반응조에서 발생한 바이오가스의 메탄과 수소함량은 Porapak-Q 컬럼(6ft × 1/8 “, SS)과 TCD 검출기가 장착된 GC(Gas Chromatograph Clarus 580, PerkinElmer Co., Ltd.)를 이용하여 분석하

였다. 생물전기화학 혐기성 회분식 반응조의 메탄생성량은 부유식 가스수집기에서 관측된 바이오가스발생량과 바이오가스의 메탄의 함량변화로부터 다음 식 6.1을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Equation 6.1: } V_{CH_4} = C_{CH_4}(V_{RH} + V_{GT} + V_{GC})$$

여기서, V_{CH_4} 는 메탄의 누적 생산량(mL)이며, C_{CH_4} 는 모니터링한 바이오 가스에서 메탄의 함량이다. V_{RH} 는 회분식 소화조의 헤드 스페이스 부피이며, V_{GT} 는 소화조와 가스 수집기 사이의 고무 튜브의 부피, V_{GC} 는 가스 수집기의 가스부분 부피이다. 생물전기화학 혐기성 회분식 실험에서 관측한 메탄발생량은 다음 식 5.2를 이용하여 수증기압과 온도를 보정함으로써 STP 상태로 전환시켰다.

$$\text{Equation 6.2: } V_{CH_4}(mL, STP) = V_{CH_4}(at T) \times \frac{273}{(273 + T)} \times \frac{(760 - W)}{760}$$

여기서, T는 운전온도인 35°C이며, W는 T°C에서의 수증기압(mmHg)이다.

회분식실험 종료직전 벌크용액에 대하여 cyclic voltammetry(CV) 실험과 electrochemical impedance spectroscopy(EIS) 실험을 수행하였다. 작업전극과 대전극은 각각 작은 스텐망 조각(1cm×1cm)을 이용하였으며, Ag/AgCl 전극을 기준전극으로 사용하였다. CV 실험은 정전위장치(ZIVE SP1, WonA Tech, Korea)를 이용하여 1.0 V에서 1.0 V 까지 10 mV/sec 속도로 스캔하는 방법으로 진행하였다. Smart manager software (ZIVE BP2 Series, WonATech, Kore)를 사용하여 cyclic voltammogram으로부터 redox 피크전위와 전류를 구하였다. EIS 실험은 전기화학장치(ZIVE SP1, WonA-Tech, Korea)를 사용하여 100Hz ~ 2MHz의 주파수범위에서 100mV의 교류신호 진폭을 전극에 인가하여 수행하였다(Feng et al., 2018a). EIS 값은 ZMAN 2.4 software (ZIVE LAB, WonA-Tech, Korea)을 사용하여 등가회로 모델에 적용시켰다. 4가지 임피던스 성분이 직렬로 연결된 등가회로 모델을 사용하였다. 임피던스성분은 1) solution resistance(R_s), 2) charge transfer resistance(R_2)와 Warburg element(W)가 병렬연결되어 구성된 임피던스, 3) constant phase element (Q)와 Activated carbon element(R_1)가 병렬연결되어 구성된 임피던스, 4) Inductance element(L)가 직렬연결되어 구성되

었다. 생물전기화학 혐기성소화반응조에서 메탄생성이 더 관측되지 않을 때 액체시료를 채취하였다. 채취한 시료를 0.45 μm GF/C 멤브레인으로 여과한 후 DOC(용존유기탄소)가 1 mg/L로 되게끔 희석한 뒤 Spectrofluorphotometer (RF-6000 SHIMADZU; Wavelength: Excitation (Ex) 220~400nm/ Emission (Em) 250~600 nm)를 이용하여 Excitation emission matrix (EEM) spectra를 구하여 갈탄의 분해과정에서 생성된 중간생성물들을 분석하였다 (Chen et al., 2003).

6.3. 결과 및 토의

6.3.1 생물전기화학 혐기성 소화조의 정전기장에서 석탄의 메탄 전환

공시료 소화조를 포함한 대조구 및 활성탄을 추가한 소화조 모두에서 초기 2일 동안 메탄발생량은 급격하게 증가하였으며 최대발생속도는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 6.2a). 이것은 혐기성 배지에 주입한 효모 추출물에 함유된 쉽게 생분해 가능한 아미노산의 메탄전환에 의한 것으로 사료된다. 초기에 지체 기간 없이 즉시 메탄이 생성된 것은 효모 추출물에 함유된 영양소들에 의해 식중 미생물이 빠르게 적응하였다는 것을 나타낸다. 이후 공시료 소화조에서는 더 이상 메탄발생이 관찰되지 않았다. 이것은 미생물이 대사에 이용할 수 있는 기질이 고갈되었기 때문인 것으로 보여진다. 활성탄을 포함한 전도성 물질은 혐기성소화에서 EFB와 EMA 사이의 DIET를 촉진하는 것으로 알려져있다(Kato et al., 2012; Feng et al., 2018b; Baek et al., 2018; Park et al., 2018). 하지만 활성탄을 추가하지 않은 대조구에서 메탄 발생량은 3일째 누적메탄발생량이 172.2mL이었지만 활성탄을 추가한 AE00 및 AE17에서는 각각 158.3mL, 137.9mL이었다. 이것은 활성탄이 석탄의 가수분해를 촉진하여 가수분해 및 산발효 중간생성물의 축적에는 기여를 했으나 중간생성물의 메탄생성 억제작용을 극복하지 못하고 메탄을 발효시키지는 못했다는 것을 시사한다. AE17에서 메탄생성량이 AE00보다 적은 것은 석탄의 가수분해 및 산발효 반응이 전기장에 의해 좀 더 급격하게 진행되어 독성을 가진 중간생성물들이 좀 더 많이 축적되었기 때문이다. 하지만 전기장세기가 0.67 V/cm인 AE67 에서 식중 직후 누적메탄 발생량은 운전시간에 따라 급격하게 증가하여 3일째 187.5mL까지 생성되었으

며 이후 10일동안 서서히 증가하면서 최종 누적메탄발생량은 218.1mL까지 도달하였다. AE67에서 석탄의 생물학적 메탄수율은 35.0mL/g lineite이었으며 이는 활성탄을 추가하지 않은 이전 연구의 메탄수율 25.1 mL/g lineite 보다 훨씬 높았다. 이는 활성탄이 0.67 V/cm의 전기장하에 미생물지간의 cDIET의 매개체로서 메탄전환을 극대화하기 위한 DIET를 촉진한 것으로 사료된다. 또한 전기장 세기가 0.33V/cm인 AE33에서도 식중 직후 메탄발생량은 급격하게 증가하여 3 일째 177.9mL까지 생성되었다. 이것은 전기장세기가 0.33V/cm 이상이며 활성탄이 첨가된 생물전기화학 혐기성소화조 메탄생성을 위한 EFB와 EMA 사이의 DIET를 촉진시켰음을 나타낸다. 이전 연구에서 활성탄이 없는 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조에서 0.33V/cm의 전기장세기는 석탄의 가수분해는 촉진시켰지만 메탄발효에서는 기여를 하지 못한 것으로 보고되었다(제4장). 이것은 생물 전기화학 혐기성 소화조에서 활성탄을 포함한 전도성물질은 메탄생성을 위한 cDIET를 촉진한다(Liu et al., 2012; Xu et al., 2015)는 이전의 연구결과와 일치하다. 활성탄이 존재하는 AE67와 AE33에서 전기장에 의해 쉽게 분해 가능한 기질을 이용하여 메탄을 급격히 생산하는 과정에서 전기활성미생물이 좀 더 풍부하게 된 것 같다. 그리고, 풍부해진 전기활성균들 사이의 DIET 반응에 의하여 석탄의 가수분해 및 산발효 산물의 메탄전환 반응이 이루어졌다는 것을 나타낸다 (Piao et al., 2018). AE67에서 발생한 누적메탄생성량은 AE33보다 현저하게 높았으며 석탄의 생물학적 메탄수율도 AE33의 12.2 mL/g lineite보다 높았다(Table 6.1). 이것은 분극 전극을 갖는 생물전기화학 혐기성 소화조에서 전기장세기는 독성이 있는 석탄의 가수분해 중간생성물들의 분해 및 메탄발효반응에 있어서 DIET의 중요한 요소임을 시사한다. 메탄생성의 급격한 증가 이후 대조구, AE00, AE17, AE33에서 누적메탄발생량이 점차적으로 감소하는 현상을 나타냈다(Fig. 6.2a). 이것은 Methanotrophs에 의해 메탄이 소비된 것으로 보인다. 일반적으로 Methanotrophs는 산소, 황산염, 질산염 등의 전자수용체가 존재하는 환경에서 다양한 종류의 alkanes, aromatics, halogenated alkanes 등을 분해하는 능력을 가지는 것으로 알려지고 있다(Murell and Radajewski, 2000; pandey et al., 2014; Wang et al., 2015). 그러나 산소가 없는 혐기성 생물전기화학 혐기성 소화조에서도 Methanotrophs 균이 풍부해진다고 알려지고 있다

(Paio et al., 2018). 생물전기화학반응조에서 메탄의 감소는 methanotrophs의 대사작용에 의한 메탄의 산화에 의한 것으로 보인다. 이용 가능한 기질이 부족한 석탄으로부터 생물학적 메탄을 생성하는 Chemostat에서는 Methanotroph의 활성이 높아지며, 전극에 전압을 인가하면 Methanotrophs의 활성이 더욱 높아지는 것 같다. 초기 식중 10일 후 메탄발생의 뚜렷한 증가가 관측되지 않았다. 하지만 AE17, AE33, AE67의 잔류유기물의 SCOD는 모두 3000 mg/L이상이었으며 AE00와 대조구의 SCOD는 각각 2856 mg/L, 2686 mg/L이었다. 이것은 전기장이 석탄의 가수분해 및 산발효를 촉진하여 독성을 가진 중간생성물이 축적되었으며 소화조에 잔류하는 SCODs는 각각 메탄생성반응을 저해하는 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 한계농도로 보인다. 중간생성물로부터의 추가적인 메탄생성은 이전 연구에서 증명된 바와 같이 혐기성 슬러지와 효모 추출물의 보충으로 증진시킬 수 있다.

10일 후 AE67에 혐기성 슬러지와 효모 추출물을 보충하였을 때 누적 메탄생성량은 지체 기간 없이 2일간 급격히 증가하였으며 그 후로는 서서히 증가하여 9일 이내에 171.0mL까지 증가하였다(Fig. 6.2b). 이것은 보충한 혐기성 미생물 및 효모 추출물에 의해 공급된 영양소와 쉽게 생분해 가능한 아미노산으로 인해 석탄분해에 관여하는 혐기성 미생물이 풍부해졌으며, 이들이 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로 이루어진 잔류유기물을 빠르게 분해하여 메탄을 생성시켰음을 나타낸다. 공시료 소화조를 통하여 효모 추출물 및 혐기성 슬러지에 함유된 유기물로부터 발생한 메탄발생량을 보정한 이후 AE67에서 석탄으로부터 발생한 메탄의 총수율은 19일만에 98.0 mL/g lignite로 대단히 높았다 (Fig. 6.3). 이전 연구에서는 Yeast, algae 및 cyanobacteria와 같은 생물 추출물을 주입하거나, 호기성 전처리 등의 방법으로 석탄의 메탄생성을 향상시킬 수 있었으나, 메탄 수율은 2.93 -4.98mL/g coal로 낮았다 (Davis et al., 2018). 석탄의 메탄 수율은 석탄의 종류에 따라서도 큰 차이를 보였는데 갈탄의 경우 최대 메탄 수율은 7.4 mL/g coal 이었다 (Davis et al., 2018, Zheng et al., 2017). 그리고 생물전기화학반응조에서 석탄의 메탄전환율을 54.5 mL/g lignite 까지 증진시킨 보고가 있었다(Piao et al., 2018). 또한 석탄의 메탄전환반응은 전기장(0.67V/cm) 하에서 효모 추출물에 의해 석탄의 메탄전환에 관여하는 전기활성미생물의 풍

부하게 함으로서 향상시킬 수 있으며, 효모 추출물과 식종슬러지를 보충하면 석탄의 가수분해 및 산발효 생성물로부터 추가적인 메탄생성이 가능하여 석탄의 메탄 수율을 극대화할 수 있음을 지난 연구에서 밝혔다. 이에 더불어 AE67에서는 활성탄의 추가로 19일이라는 짧은 시간에 메탄 수율을 98.0mL/g lignite 까지 증진시켰다(Fig. 6.3). 한편 0.33V/cm보다 낮은 전기장에서 혐기성 슬러지 및 효모 추출물의 보충 후 메탄발생량이 대조구나 공시료 소화조보다 낮았다. 낮은 전기장세기는 전기활성미생물들의 메탄생성을 위한 DIET를 촉진하지 못하며 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물에 의해 대사과정이 억제된다는 것을 입증해준다.

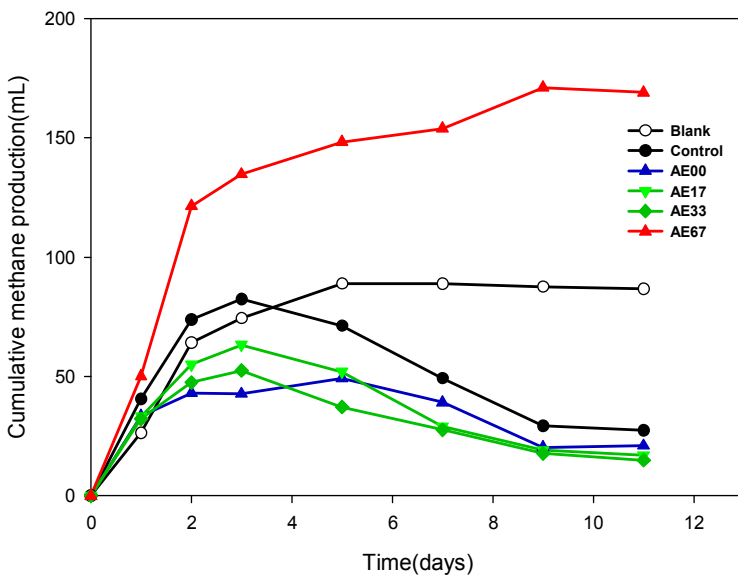
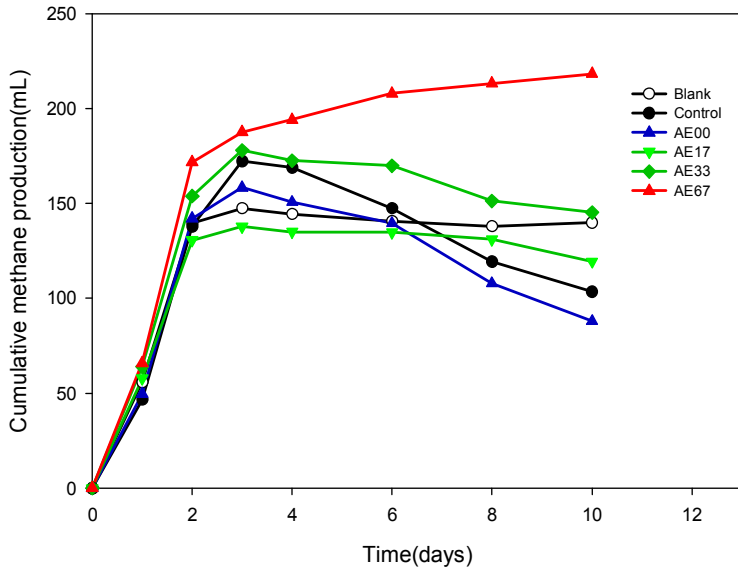


Fig. 6.2. Cumulative methane production from coal a)Initial batch and b) Additional batch.

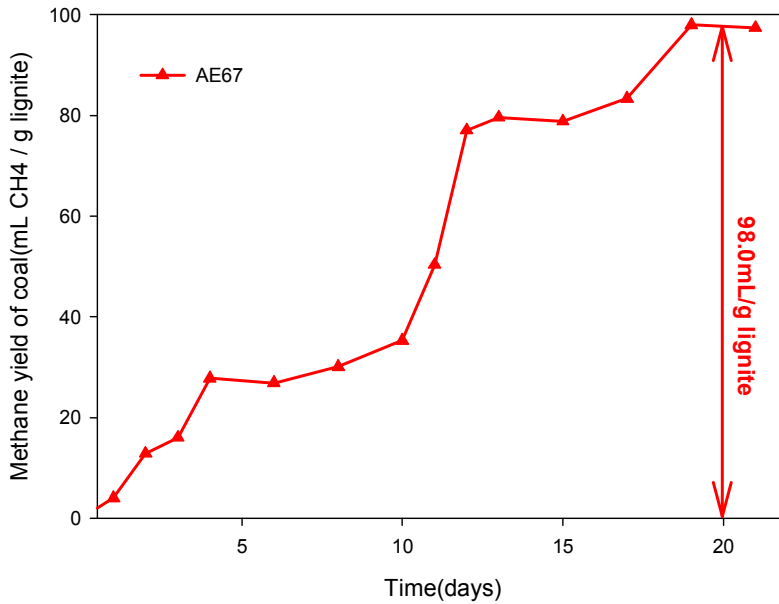


Fig. 6.3. Methane yield of coal in AE67.

6.3.2 생물전기화학적 석탄의 가수분해 및 발효

생물전기화학 혐기성 회분식 반응조에서 초기 식종 10일 후 메탄의 현저한 생성이 관측되지 않을 때 AE00, AE33, AE67 소화조의 잔류 SCODs는 각각 3,782 mg/L, 3,580 mg/L, 3,499 mg/L이었으며 대조구의 2,852 mg/L 보다 높았다(Table 6.1). 이들 잔류 SCODs는 각각 메탄생성반응을 저해하는 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 한계농도이다.

Table 6.1 Methane conversion of coal in bioelectrochemical reactor exposed to an electrostatic field

Content		Control	AE00	AE17	AE33	AE67
Cumulative CH ₄ (mL)	Initial batch	172.2	158.3	137.9	177.9	218.1
	Additional batch	82.4	49.3	63.3	52.4	171.0
Total CH ₄ yield (mL/g lignite)	initial+additional				12.2+0	35.0+63.0 =98.0
	End of initial batch	2686.3	2855.9	3017.6	3043.5	3127.8
SCOD(mg/L)	End of additional batch	1482.5	1981.5	2163.7	2246.2	1865.4

석탄의 가수분해 중간생성물의 정성분석은 기존의 중간생성물의 정성과 비교하여 활성탄의 역할을 예측하는데 필요하다. EEM 스펙트럼에서는 모든 반응조의 샘플이 III 영역 (Em/Ex 400-525nm/220-250nm) 과 V 영역(Em/Ex 400-525nm / 250-280nm) 에서 강한 피크를 보였다(Fig. 6.4). 이 영역의 물질들은 fulvic acid, hydrophobic acid 및 humic acids 등을 포함하는 생물이용성이 낮고 독성이 있는 난분해성 화합물질로서 이전 연구에서 보고된 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물질들과 유사한 물질들이다(Orem et al., 2010; Gosh et al., 2014; Wang et al., 2017). 또한, 석탄 가수분해 생성물들 중에서 방향족 화합물들이 메탄으로 전환되기 위해서는 carboxylation, hydroxylation, methylation 등의 반응을 통한 ring opening 과정을 거친 후 메탄의 전구물질인 초산, 수소 등으로 전환되어야 하는 것으로 알려지고 있다 (Nzila, 2018). 이것은 석탄의 가수분해 반응에 의해 생성되는 hydrophobic, fulvic & humic acid like 화합물, 방향족화합물들이 메탄전구물질로 발효되는 과정이 석탄으로부터 바이오 메탄생성 반응의 율속단계 임을 시사한다. AE67에서는 대조구나 AE00과 달리 I 영역(Em/Ex 290-360nm / 220-230nm)에서도 상대적으로 강한 피크가 확인되었으며 AE33에

서는 I 영역에서 대조구나 AE00보다는 강하나 AE67보다 약한 피크가 관측되었다. 이것은 석탄의 가수분해는 단계별로 진행되며 전기장 세기의 크기에 의존한다는 것을 나타낸다. 메탄생성을 위한 DIET은 초산, 수소와 같은 중간생성물을 거치는 메탄생성반응(MIET)보다 독성물질이나 환경조건에 영향을 적게 받는 것으로 알려지고 있다 (Feng et al., 2018a; Yuan et al., 2011). AE67에서의 SCODs 한계농도가 대조구보다 높았다. 이것은 EB와 EMA가 AE67에서 0.67 V/cm의 정전기장에 의해 enrich 되었고 전기활성균들의 DIET에 의해 메탄이 생성되었음을 시사한다. AE33에서는 IV 영역(Em/Ex 290-330nm / 250-280nm)에서도 상대적으로 강한 피크가 확인되었으며 이는 AE33에 Tyrosine- & Protein과 같은 불용성 단백질과 아미노산기(C₉H₁₁NO₃-)의 중간생성물질들이 공존한다는 것을 의미한다. Control과 AE00에서는 석탄의 가수분해가 IV 영역에 해당하는 유기물질로 분해되지 못했으며 AE67에서는 IV 영역에 해당하는 유기물질이 높은 전기장세기의 영향하에 I 영역에 해당하는 유기물로 발효되었을 가능성이 있다. 혐기성 소화에서 유기물의 가수분해 동안, 지질, 탄수화물 및 단백질과 같은 불용성 유기 중합체는 먼저 가용성 단량체로 분해되며, 지방산, 아미노산 및 당류를 포함한 단량체 물질은 산성 박테리아에 의해 암모니아, 유기산, 수소 및 이산화탄소와 같은 유기 분자로 발효된다. 혐기성 슬러지와 효모 추출물을 보충한 후 AE33의 메탄전환율을 관찰해 보았을 때 다른 반응조보다 더 작았다. 이것은 III 영역과 V 영역의 중간대사산물과 IV 영역의 가수분해산물이 모두 AE33의 메탄생성을 저해하는 것으로 사료되며 EB와 EMA 사이의 DIET가 AE67에 비하여 상대적으로 기여하지 못한다.

그러나, AE00에서는 식종직후 발생한 누적메탄량이 공시료 소화조보다 상당히 작았으며, 메탄발생이 완료된 후의 잔류 SCOD는 2,856 mg/L로서 대조구와 비슷하였다(Table 6.1). AE00에서 벌크용액의 EEM 스펙트럼에서 aromatic compounds 들의 농도가 상대적으로 낮았으며, hydrophobic acid 및 fulvic acid like 성분들의 농도는 AE67보다 다소 높았다(Fig. 4.3b). AE00에서 효모 추출물에 함유된 쉽게 분해 가능한 아미노산의 메탄전환반응에 대한 저해는 주로 hydrophobic acid 및 fulvic acid like 성분들에 의해 발현되며, hydrophobic acid 및 fulvic acid like 성분들을 발효시켜 메탄을 생성하는 DIET가 AE00에서는 발

현되지 않은 것 같다. AE00에서 DIET-base의 메탄생성이 활성화 되지 않았으며 활성탄의 존재는 일정한 전기장 세기의 환경에서 전기활성 미생물을 풍부하게 하고 DIET-base의 메탄생성을 유도하는데 매개체 역할을 하며 전계 강도는 메탄생성의 중요한 영향인자인 것 같다. 대조구에서는 EEM 스펙트럼이 250-600 nm / 220-400 nm (Em / Ex) 사이에 관찰되었고, 잔류 SCOD의 주성분은 fulvic acid과 humic acid-like substances로 확인되었다. 대조구에서 혐기성 미생물들은 Fulvic acid 및 Humic acid like 성분들과 같은 석탄의 가수분해 및 산발효에 의해서 생성된 중간생성물들에 의해 메탄생성과 관련된 대사과정이 크게 저해를 받는다.

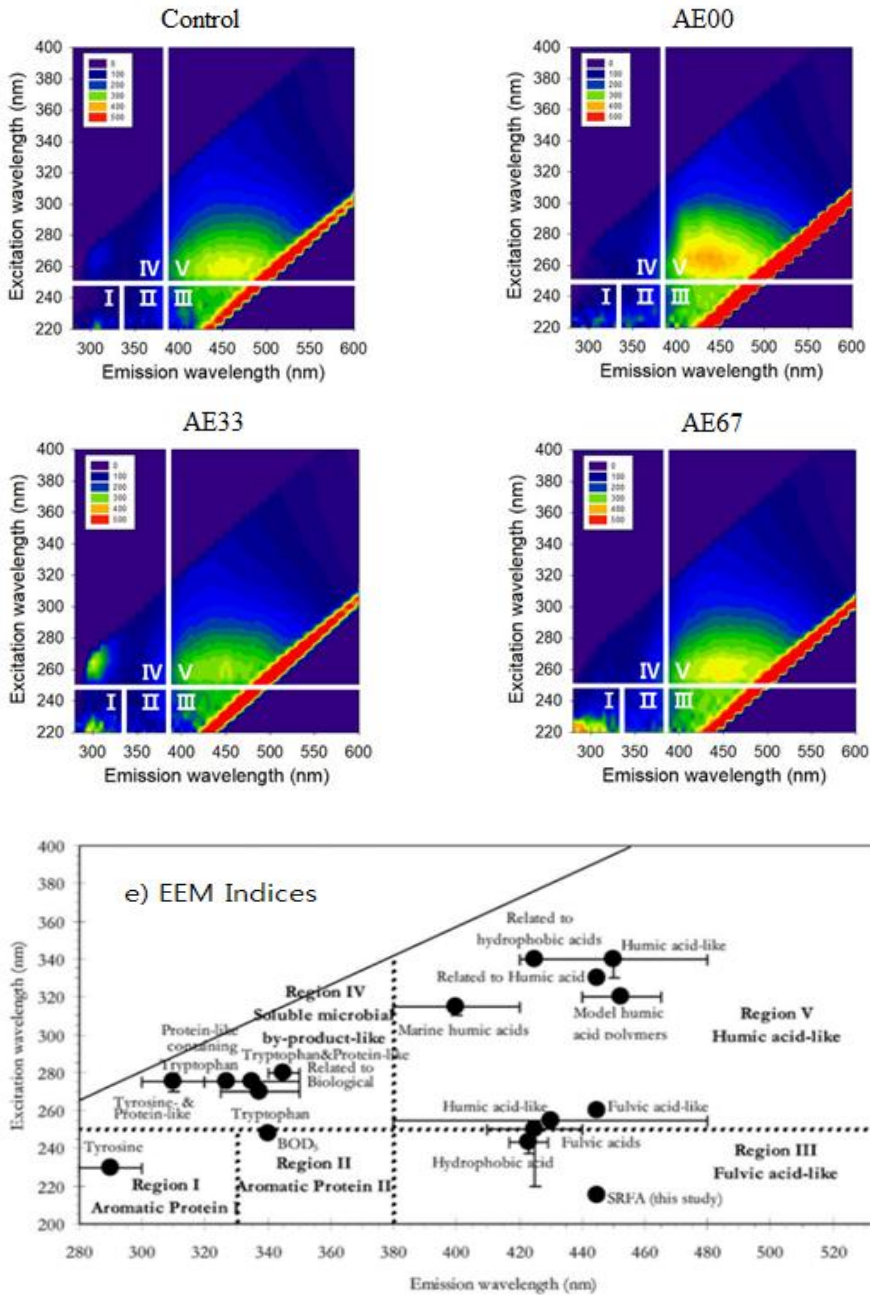


Fig. 6.4. Excitation Emission Matrix for hydrolyzed products a) Control, b) AE00, c) AE33, d) AE67 and e) EEM Indices

6.3.3 정전기장에 노출 된 벌크용액의 Cyclic voltammogram

벌크용액의 Cyclic voltammogram(CV)는 생물전기화학 혐기성 소화조의 EFB 및 EMA를 포함한 전기활성 미생물들의 유용한 정보를 제공한다 (Harnisch and Freguia 2012; Uria et al., 2017). 전자전달은 전기활성 미생물과 다양한 비생물적인 산화환원물질에 관여하며 생물전기화학반응조에서 관측되는 cyclic voltammogram (CV)의 redox peaks는 일반적으로 exoelectrogens, electrotroths 및 활성탄과 같은 전자전달매개체들에 의해 생성된다(Harnisch and Freguia, 2012; Feng et al., 2018a). 그리고 Formal potential (E_f)은 전기활성미생물이나 전자전달매개체의 종류에 따라 $-0.43V \sim 0.5V$ vs Ag/AgCl 의 범위에서 다양하게 나타난다 (Lim et al., 2017; Feng et al., 2018, Piao et al., 2018). AE17, AE33, AE67에서 산화 환원 피크쌍은 각각 $0.298/-0.035V$ vs Ag/AgCl, $0.403/0.044V$ vs Ag/AgCl, $0.343/0.003V$ vs Ag/AgCl에서 발견되었으며 E_f 은 각각 $0.13V$, $0.17V$, $0.22V$ 로 전계강도의 크기에 따라 양의 방향으로 이동하였다 (Table 6.2). 이것은 전계강도의 크기에 따라 메탄전환율이 순차적으로 높았던 결과와 일치하며 $0.67V/cm$ 의 전기장이 메탄전환에 DIET를 촉진하는 전기활성 미생물을 풍부하게 하며 메탄생성을 크게 개선한다는 것을 시사한다. 그러나 AE17에서 전기활성 미생물이 관측되었음에도 불구하고 메탄생성이 대조구나 공시료 소화조보다 작은 것은 $I_{p,ox}/I_{p,red}$ 가 $0.38/1.39mA$ 로 AE33, AE67보다 낮았으며 메탄전환에 참여하는 미생물이 중간생성물에 의해 억제된 것으로 사료된다. 대조구에서 E_f 는 음의 값($-0.25V$)으로 나타났으며 이것은 벌크용액에서 산화환원 피크에 관여하는 redox 물질들이 다른 반응조와 차이가 있다는 것을 보여주었다. 혐기성 소화조에서는 표준상태에서 산화환원전위가 $-0.4V$ vs Ag/AgCl 이하일 때 열역학적으로 이산화탄소가 환원되어 메탄이 생성될 수 있다 (Piao et al., 2018). 대조구의 환원피크가 $-0.4V$ 보다 작은 $-0.45V$ 인 것은 대조구에서는 exoelectrogens 및 electrotroths사이의 DIET가 아닌 이종간접전자전달로 이산화탄소가 환원되어 메탄으로 생성되는 확률이 높다. 따라서, 대조구의 redox 물질들이 석탄의 메탄전환반응에서 DIET에 관여하였을 가능성은

낮다.

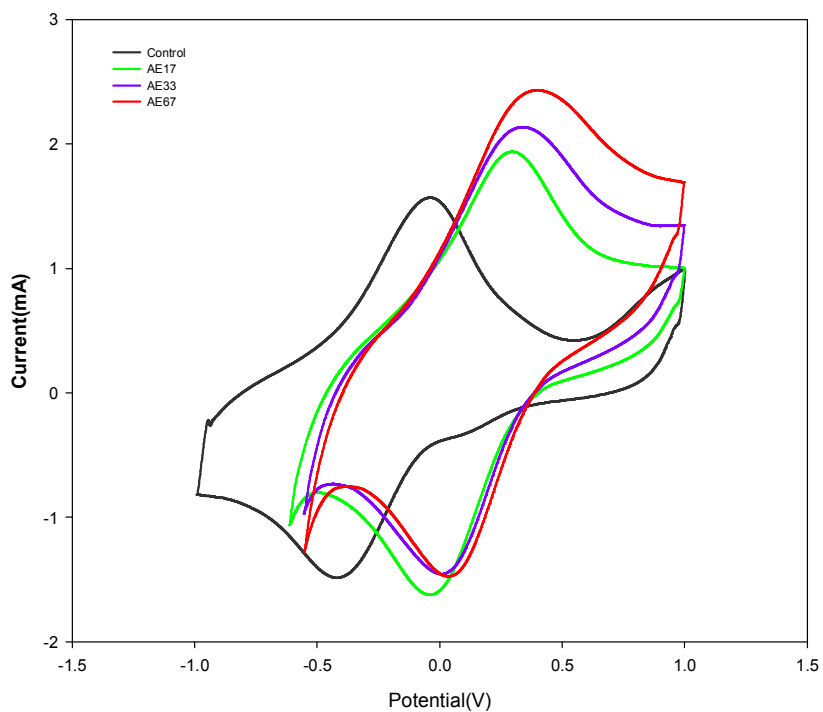


Fig. 6.5. Cyclic voltammogram in the initial batch experiment for the methane conversion of coal.

Table 6.2. Redox peaks in Cyclic voltammogram

Redox peaks in CV	Control	AE17	AE33	AE67
Ep,ox/Ep,red (VvsAg/AgCl)	0.037/-0.453	0.298/-0.035	0.343/0.003	0.403/0.044
Ef(VvsAg/AgCl)	-0.25	0.13	0.17	0.22
Ip,ox/Ip,red(mA)	0.67/0.60	0.38/1.39	0.52/1.19	0.50/1.14

6.3.4 벌크용액의 임피던스

생물전기화학 혐기성 소화조에서 EIS는 저항특성과 캐패시터의 특성에 의존한다. 활성탄이 첨가된 AE00, AE17, AE33, AE67에서 주파수에 따른 bode plot의 임피던스 진폭과 위상변이는 다소 유사하지만 대조구와 큰 차이가 있었다(Fig. 6.6a). EIS 데이터를 등가회로에 맞추어 얻은 벌크 용액의 ohmic resistance (R_s)은 AE67에서 $2.35\ \Omega$ 이며 AE00, AE17, AE33 및 대조구(2.74, 2.76, 2.38, 6.83)보다 작았다(Table 6.3). 벌크용액 내부의 R_s 은 액체 매질, 활성탄 입자와 석탄 입자 및 미생물세포에 의해 유발된다. 전기활성미생물에서 cytochrome을 포함한 전도성 단백질은 세포외막으로 확장되며 (Leang et al., 2010; Lovley, 2011), 이는 벌크용액에서의 R_s 이 생물전기화학 혐기성 소화조에서 전기활성미생물의 농도를 나타낸다는 것을 의미한다 (Lovley, 2011; Dubé and Guiot, 2015; Zhao et al., 2015). 생물전기화학 혐기성 소화조에서, 전자전달저항(R_{ct})은 DIET에 필요한 활성화 과전압과 관련되며, 이는 전기활성 미생물을 풍부하게 함으로써 감소된다. AE17, AE33 및 AE67에서 전자전달저항은 각각 $88.85\ \Omega$, $74.03\ \Omega$, $65.84\ \Omega$ 로써 전계강도의 크기에 따라 감소하였다. 이는 $173.69\ \Omega$ 의 AE00보다 작았으며 $310,553.0\ \Omega$ 의 대조구보다 현저하게 작다. 이것은 정전기장이 석탄의 가수분해 및 산발효, 그리고 메탄발효를 위한 전기활성미생물을 풍부하게 함으로써 전자전달저항이 감소한 것으로 보인다. 또한 AE00의 전자전달저항이 대조구의 전자전달저항보다 작은 것은 활성탄이 전자전달 매개체로서의 역할을 할 수 있는 가능성을 나타낸다. 하지만 복합적인 분해단계와 발효단계를 포함하는 석탄

의 생물학적 메탄전환반응에서 활성탄만으로는 전기활성미생물의 DIET를 촉진하지 못한 것 같다.

Nyquist plot(Fig. 6.6b)에서 보는 바와 같이 EIS값은 고주파에서 모든 반응조에서 Inductance가 발현되었다. 구체적인 Inductance의 성분에 대해서는 심층 연구가 필요하다.

Table 6.3. Electrochemical properties in EIS for the bulk solution.

Content	Control	AE00	AE17	AE33	AE67	
R_s (Ω)	6.83	2.739	2.761	2.38	2.346	
Q_y	204.393u	15.802m	38.307m	889.249u	15.198m	
Equivalent circuit: Q_a	2.153	383.251 m	30.906m	675.648m	368.426m	
R_{ct} (Ω)	310.553k	173.686	88.851	74.031	65.844	
$-R_{ct} W$ $-Q R$	W (Ω/\sqrt{s})	326.593m	56.672m	22.524m	45.22m	83.58m
$-L_s$	R (Ω)	37110	108.74	36.736	34.23	39.396
	$L(Q)$	3.139u	3.413u	3.434u	3.154u	3.404u
	r^2	0.9971	0.9952	0.9945	0.9941	0.9941

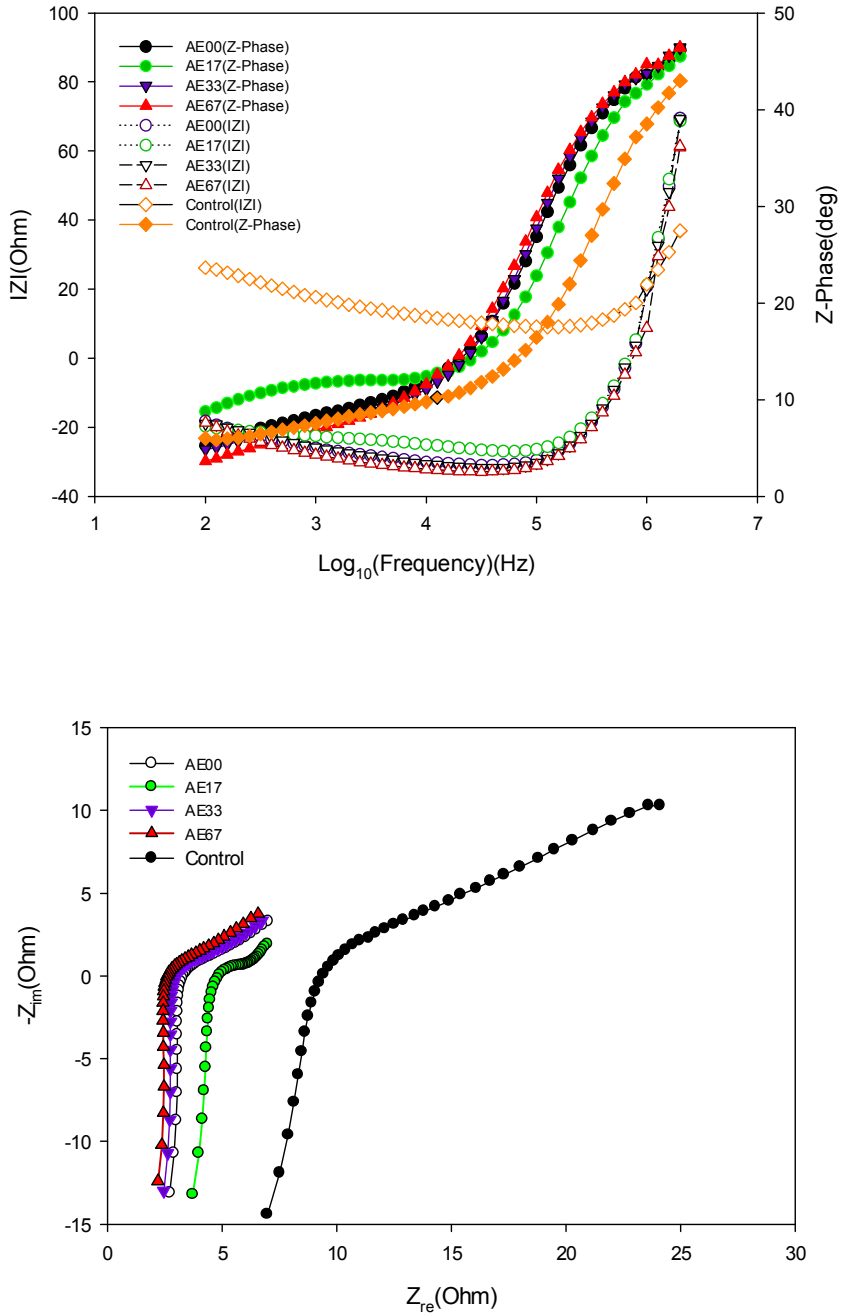


Fig. 6.6. a) Bode plot and b) Nyquist plot for the electrochemical impedance spectra in the bulk solution.

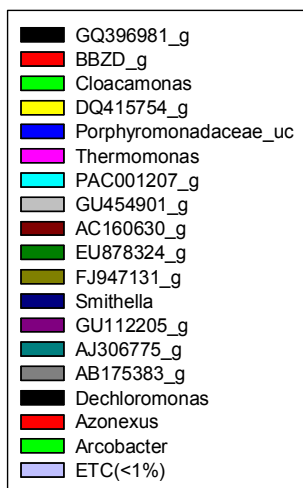
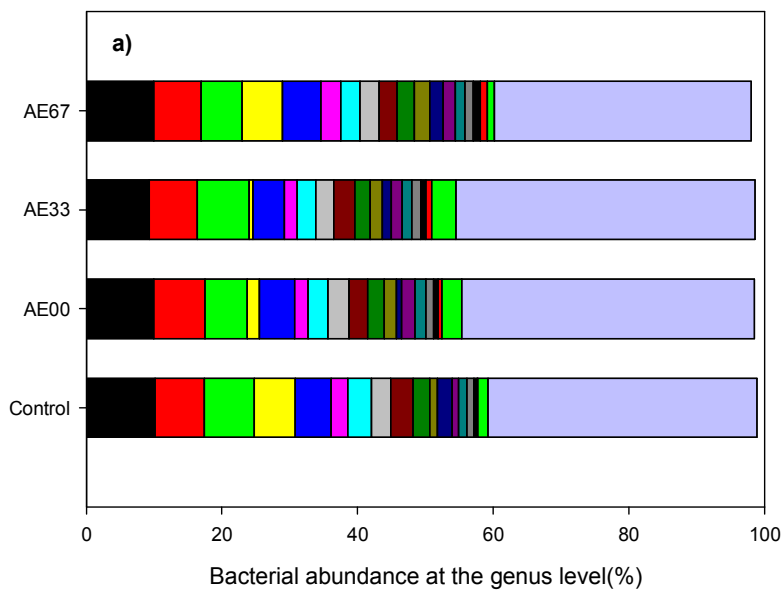
6.3.5 미생물군집

석탄의 메탄전환 실험 마지막에 생물전기화학반응조에서 벌크용액을 채취하여 미생물군집특성을 분석하였다. Bacteria community의 OTUs는 1485~1642종이었으며, Good's coverage of library는 99.5%이상이었다. Bacteria의 Valid reads는 42387~49041로 Total reads의 93.3~94.5%이었다. Archaeal community의 OTUs는 90~228종이었으며, Good's coverage of library는 99.9~100%에 달했다. Valid reads는 무려 18365~22536이었는데 이는 Total reads의 92.86~93.57%이었다. OTUs는 Bacteria군집은 Archaea군집의 7~10배로써 풍부도(Jackknife indices)와 균등도(Shannon indices)로 평가한 종의 다양성도 상대적으로 높았다(Table 6.4). 전압을 인가한 반응조에서 종의 풍부도는 대조구에 비하여 상대적으로 높았으며 균등도로 평가한 종의 다양성은 대조구에 비하여 큰 차이가 없었다. 이것은 전압이 인가된 반응조에서 석탄의 메탄전환에 기여하는 전기활성 종이 우점 성장하였다는 것을 나타낸다.

Table 6.4. Diversity indices for microbial species in bioelectrochemical anaerobic reactor

Diversity indices	Bacteria				Archaea			
	Control	AE00	AE33	AE67	Control	AE00	AE33	AE67
Total reads	44882	52433	50204	45261	24242	19628	20865	20322
Valid reads	42387	49041	46822	42770	22536	18365	19376	18970
Jackknife	1697	1873	1741	1757	96	219	236	168
Shannon	5.001	5.138	5.015	5.024	2.189	2.796	2.932	2.562
Good`s coverage of library(%)	99.5	99.5	99.6	99.5	100	99.9	100	99.9
OTUs	1485	1642	1568	1535	90	207	228	153
Valid Proportion(%)	94.44	93.53	93.26	94.50	92.96	93.57	92.86	93.35

Bacterial phylum은 모든 반응조에서 Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Cloacamonas_p 순으로 우점하였다. Genus level에서 우점한 종은 GQ396981_g, Cloacamonas, BBZD_g, DQ415754_g, Porphyromonadaceae_uc 등이 있었으며 각 소화조에서의 우점도에도 큰 차이가 없었다(Fig. 6.6a).



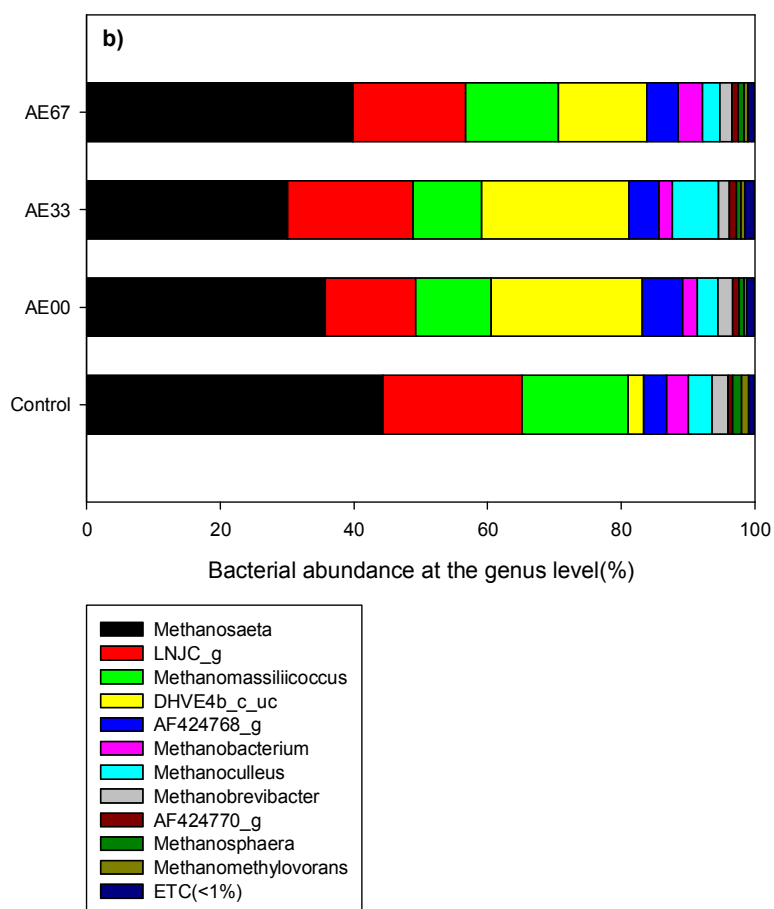


Fig. 6.7. Microbial abundance at the genus level: a) bacteria and b) archaea.

주성분분석(principal component analysis: PCA)에서는 bacterial군집의 분산은 81.9% (PC1)와 13.5% (PC2)의 두가지 주요 구성 요소에 의해 설명할 수 있다 (Fig. 6.8a). 모든 반응조는 Biplot에서 PC1과 양의 상관관계를 나타냈다. 하지만 PC2의 구성요소에 대한 상관관계는 Control, AE67과 AE00, AE33는 각각 양과 음의 관계를 나타냈다. AE67의 bacterial species 군집은 풍부한 species인 GQ396981_g CU921187_s(9.8%), BBZD_g_uc (6.5%), DQ415754_g_uc(5.9%), Porphyromonadaceae_uc(5.6%), Cloacamonas acidaminovorans(3.2%)에 의해서 가장 큰 영향을 받았다. C. acidaminovorans는 아미노산을 발효시켜 탄소와 에너지를 획득하는 syntrophs이며, 생물전기화학반응조에서 자주 발견된다 (Feng et al., 2016; Pelletier E et al., 2008). bacterial의 species level에서 대조구의 우점종은 AE67과 유사하였다. 흥미롭게도 AE00과 AE33에서 DQ415754_g_uc는 Control과 AE67에서 우점한 DQ415754_g_uc종이 불과 1.8% 및 0.5%이었으나 같은 Family인 DQ415754_f_uc가 각각 5.1 및 7.0%이었다. 이 Family 종은 이전 연구에서 황화물이 풍부한 대수층으로부터 분리되었다(Macalady et al., 2006).

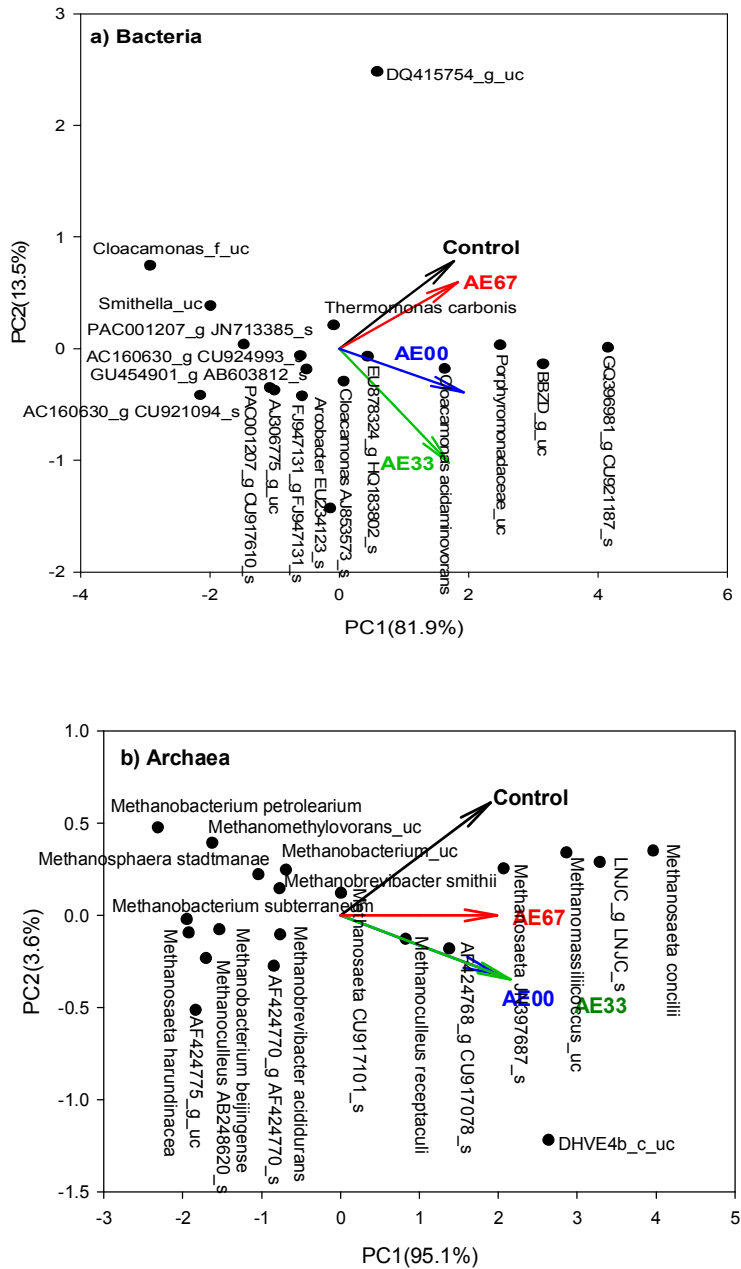


Fig. 6.8. Biplot for the microbial species communities in the bulk solution: a) bacteria, b) archaea.

Archaeal의 Genus level에서 모든 소화조에서 우점한 미생물 군집은 Methanosaeta, LNJC_g, Methanomassiliicoccus이었다. DHVE4b_c_uc은 활성탄이 존재하는 소화조에서는 우점(AE00: 22.6%; AE33: 22.1%; AE67: 13.2%)하였으나 대조구에서는 2.3%로 현저하게 낮았다. PCA에서 archaeal 군집은 두 가지 주요 구성 요소 (PC1, 95.1 %, PC2, 3.6 %)로 설명할 수 있다 (Fig. 6.8b). Biplot은 AE67의 archaeal species 들이 PC1과 아주 밀접한 상관관계가 있다는 것을 보여준다. AE67의 species level에서 우점한 종은 Methanosaeta concilii(30.0 %), LNLC_g LNJC_s (Accession LNJC01000028; 16.8 %), Methanomassiliicoccus_uc (13.8 %), DHVE4b_c_uc(13.2%)의 순이었다. 대조구에서도 Methanosaeta concilii(33.1 %), LNLC_g LNJC_s (Accession LNJC01000028; 20.6 %), Methanomassiliicoccus_uc (15.9 %)은 풍부했지만 DHVE4b_c_uc(2.3%)은 AE67보다 현저하게 적었다. 또한 AE00과 AE33에서도 Methanosaeta concilii(33.1 %), LNLC_g LNJC_s (Accession LNJC01000028; 20.6 %), Methanomassiliicoccus_uc (15.9 %)은 우점했지만 대조구나 AE67과 비교하여 감소하였다. M. concilii는 acetoclastic methanogen으로 잘 알려져 있지만 생물전기화학 혐기성 소화조에서 DIET와 관련된 electrotrophic methanogen이기도하다 (Patel, 1984; Patel, 1990, Rotaru et al., 2014). Methanomassiliicoccus spp.는 Methanomassiliicoccus luminyensis와 Methanomassiliicoccus intestinalis를 포함하여 CO₂ 존재 하에서 에너지 원으로 수소와 메탄올을 사용하여 메탄을 생산하는 bacteria 이다 (Dridi et al., 2012; borrel et al., 2013). 최근에, Methanomassiliicoccus는 항생제를 분해하는 생물 전기 화학 반응기에서 발견되는 전기 영양 메탄생성 물질이라는 것이 밝혀졌다(Zhang et al., 2017). M. concilii와 Methanomassiliicoccus_uc의 풍부도가 AE00과 AE33에서 감소했다는 것은 그들이 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물을 대사하지 못하고 억제되었음을 나타낸다.

6.3.6. 시사점

메탄은 청정에너지원으로서 각광받는 천연가스의 주성분이다. 석탄의 생물전기

화학 혐기성 메탄전환은 재래식 석탄연소에 의한 오염물질을 줄이고 안정적인 친환경 에너지 자원을 확보하는데 중요하다. 지금까지 석탄의 생물학적인 메탄 전환을 촉진시키기 위하여 많은 방법들이 시도되어 왔지만 아직까지 석탄에서 전환되는 메탄 수율은 상업화 되기엔 너무 낮았다(Zhang et al., 2016; Yi et al., 2017; Zheng et al., 2017; Davis et al., 2018; Song et al., 2016).. 석탄에 함유된 유기물질은 복잡한 구조의 다환 방향족화합물로서 가수분해되어 생성되는 중간 생성물은 혐기성미생물의 메탄전환에 저해작용을 한다(Piao et al., 2018). 메탄 생성의 율속단계로 알려진 석탄의 가수분해 중간생성물의 잔류 SCODs의 한계 농도는 전기활성 미생물들의 DIET를 억제하여 메탄생성을 저해한다. 전기활성 미생물은 활성탄, 탄소나노튜브 및 자철석과 같은 전도성 물질의 표면에서 풍부해질 수 있으며 (Kato et al., 2012; Liu et al., 2012; Xu et al., 2015; Salvador et al. 2017; Yu et al., 2018; Paek et al., 2018) 메탄생성반응에 참여하는 중간 직접전자전달에서 도관역할을 한다(Kato et al., 2012; Shen et al., 2016). 본 연구에서는 석탄의 생물전기화학 혐기성 소화조의 벌크용액에 활성탄을 주입하여 전압을 인가하지 않은 AE00, 전기장세기가 각각 0.17 V/cm, 0.33 V/cm, 0.67 V/cm인 소화조 AE17, AE33, AE67에서 전기활성미생물의 DIET을 통한 메탄생성을 비교하였다. 결과 초기단계에서 AE33과 AE67에서 석탄의 메탄전환율은 각각 12.2 mL/g lignite 및 35.0 mL/g lignite이었다. 이전 연구에서 0.33 V/cm의 전기장에서 전기활성미생물은 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 축적에 의해 억제되어 중간생성물로부터 메탄을 발효하지 못한 것으로 나타났으며 0.67 V/cm의 전기장에서 석탄의 생물학적 메탄수율은 25.1 mL/g lignite이었다. 이것은 활성탄은 전기장세기가 0.33V/cm 보다 높은 전계강도에서 석탄의 메탄 전환에 참여하는 미생물사이에 DIET를 촉진하는 미개체 역할을 한다는 것을 시사한다. 하지만 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 잔류 SCOD가 한계 농도에 도달한 후 혐기성 슬러지 및 효모 추출물을 추가한 후 AE33에서 더는 중간생성물로부터 메탄생성을 관측할 수 없었다. 초기단계에서 활성탄은 미생물의 DIET를 촉진하는 미개체 역할을 할 수 있었지만 잔류 SCOD의 농도가 높은 환경에서는 중간생성물의 독성을 극복하지 못한 것으로 나타났다. 그러나 AE67에서는 혐기성 슬러지와 효모 추출물을 추가한 후 석탄의 메탄전환율이

19일만에 98.0mL/g coal 까지 증가되었다.

6.4. 결론

생물전기화학혐기성소화조에서 정전기장은 석탄의 메탄 전환을 향상시키기 위해 전기활성을 가진 EFB와 EMA사이의 직접적인 중간 전자 이동을 촉진한다. 그리고 복합적인 가수분해 및 산발효단계와 메탄발효반응을 포함하는 석탄의 생물학적 메탄전환반응에서 활성탄은 초기단계에 0.33V/cm 보다 큰 전기장세기의 환경에서 매개체 역할을 발현할 수 있었다. 혐기성 슬러지와 효모 추출물의 보충후 0.67V/cm의 전기장이 전기활성미생물의 DIET를 효과적으로 촉진하여 석탄의 생물학적 메탄전환을 극대화할 수 있었으며 메탄전환율은 19일만에 98.0mL/g linite이었다.

제 7 장 종합결론 및 향후 연구

7.1 요약 및 종합결론

전 세계의 에너지 패러다임은 석탄-석유로부터 비전통가스로 이동되고 있다. 본 연구에서는 생물전기화학혐기성소화조에서 석탄의 메탄전환율을 처음으로 조사하였다.

분극된 절연전극을 설치한 생물전기화학 혐기성 소화조에서 갈탄의 생물학적 메탄생성량을 조사하고 석탄의 메탄전환반응을 제한하는 율속단계를 평가하였으며 메탄생성반응에 대한 가수분해 및 산발효 중간생성물들의 저해효과를 평가하였다. 생물전기화학 혐기성소화조에서 1V의 전압을 인가하여 24일부터 급격히 증가하여 31일만에 메탄으로의 석탄 생물학적 전환율을 54.5mL/g lignite 까지 향상시켰다. 이는 이전 연구에서 메탄전환율을 향상시키기 위해 Yeast, algae 및 cyanobacteria과 같은 영양물질을 주입하여 증가시킨 메탄 수율 1.66-2.93 mL/g coal 의 10.9-32.8배 가량 높은 값이다. 그러나 인가 전압이 2V로 증가하면, 메탄 수율은 43.7mL/g lignite로 약간 감소하였으나 석탄으로부터 메탄 생성은 13일의 더 짧은 지체시간후에 관측되었다. 인가전압이 높은 전기장에서 메탄생성에 필요한 시간을 탄축시킨 것이다. 가수분해 생성물의 PCOD의 변화를 볼 때 90%이상 가수분해 되었으나 벌크용액의 VFAs는 0.15g COD/L-0.18g COD/L 이었다. 이것은 석탄의 가수분해반응에 의하여 생성되는 중간생성물들이 메탄전구물질인 초산이나 수소로 전환되는 과정이 메탄생성반응의 율속단계이거나 이러한 중간 생성물들이 산발효균 및 메탄생성균의 활성을 저해한다는 것을 설명한다. 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물의 혐기성 독성실험에서 가수분해생성물의 함량이 20%, 40%일 때 최대메탄발생속도는 각각 62.9%, 70.8% 저해되었다. 가수분해 중간생성물의 메탄생성에 대한 저해속도를 모니터링한 결과 중간생성물이 5.7배 희석될 때 메탄 전환율은 50% 억제된다. 가수 분해 생성물을 10 배 희석하여 석탄 1g 당 CODr 106.3 mL의 추가 메탄을 생산했는데 이는 55.3 mL/g lignite 이다. 석탄의 총 메탄 포텐셜은 전극 분극화

및 가수 분해 생성물의 회석에 의해 107.8 mL/g lignite 로 개선되었다.

가장 광범위하게 조사 된 지하 석탄층메탄전환의 강화전략은 영양소 첨가를 통한 생체자극이다. 본연구에서는 갈탄을 대상으로 분극된 절연전극을 설치한 생물전기화학 혐기성소화조에서 효모 추출물을 통한 생체자극의 메탄전환율에 대한 영향을 조사하였다. 본 연구에서는 0.67V / cm의 정전기장이 효모 추출물로 수정된 석탄 매체에서 exoelectrogenic bacteria와 electrorophic methanogenic archaea를 포함하여 전기활성미생물로 알려지는 species를 풍부하게 한다는 것을 발견하였다. 풍부한 bacteria species는 Cloacamonas acidaminovorans, BBZD_g_uc, Porphyromonadaceae_uc이었고 archaea species는 Methanocorpusculum spp., LNJG_g LNJG_s, Methanosaeta concilii이었다. 이 미생물 종들은 효모 추출물로 수정된 석탄에서 메탄을 즉시 생산할 수 있었다. 석탄으로부터의 즉각적인 메탄생성은 현장에서의 사용에 중요한 의의를 가진다. 그러나 메탄 생산은 가수분해 및 산발효 중간생성물의 축적에 의해 서서히 억제되었고 메탄 수율은 결국 25.1 mL / g 갈탄에서 포화되었다. 효모 추출물과 혐기성 슬러지를 보충함으로써 벌크용액에 잔류되어 있는 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로부터 추가로 메탄이 생성될 수 있음을 발견했다. 초기 접종과 추가 식종으로 인한 석탄의 메탄수율은 총 109.9 mL / g lignite에 도달했다. 생물전기화학반응조에서 효모 추출물과 식종균으로 개질한 석탄의 메탄 전환율은 현장에서 사용 가능 할 정도로 높다.

석탄의 생물학적 메탄전환율에 대한 물 전기분해의 영향을 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조에서 조사하였다. 실험을 위해 양극과 음극으로 구성된 일반전극(OE)을 티타늄호일로 준비하고 OE표면을 유전체 고분자로 코팅하여 절연전극(IE)을 얻었다. OE 또는 IE를 생물전기화학 혐기성 회분식 소화조에 설치하고, 외부 전원을 사용하여 전압을 인가함으로써 분극시켰다. 2.0 V의 전압이 인가된 OE67의 누적메탄생산은 IE67에서 생성된 메탄발생량 136 mL보다 더 높은 162.9 mL에서 포화되었다. 그러나, OE에 물 전기 분해를 위한 전압보다 낮은 전압 (0.5V, 1.0V)이 인가되었을 때, 석탄으로부터 누적메탄생산량은 블랭크보다 적었다. 이는 물이 전기분해되어 생성된 산소가 전자수용체로서 석탄의 가수분해 생성물의 개환반응을 자극한다는 것을 나타내며 물의 전기분해는 초

기단계의 석탄의 메탄전환을 개선함을 시사한다. 그러나, 효모 추출물과 혐기성 슬러지가 포함 된 혐기성 배지를 보충하면 누적메탄생성량이 IE67에서 갑자기 증가하여 OE67보다 현저히 높았다. 이는 IE67에서 석탄이 효과적으로 가수분해 되고 발효될 수 있으며, DIET를 통한 석탄의 메탄 전환은 효모 추출물과 혐기성 슬러지를 보충함으로써 0.67 V/cm의 전기장에서 자극 될 수 있음을 시사한다.

전기활성미생물 사이의 전자전달은 전극이나 전도성물질을 통하거나 직접접촉에 의하여 일어난다. 메탄생성을 위한 cDIET를 촉진시키기 위해 분말 활성탄 (3.0 g / L)을 첨가하여 0.17 V/cm ~ 0.67 V/cm 범위의 전기장에 노출된 생물전기화학 혐기성 소화조에서 석탄의 생물학적 메탄전환을 조사하였다. 0.67 V/cm의 전기장에 노출된 소화조 AE67에서 석탄의 초기 메탄수율은 35.0 mL/g lignite이었다. 활성탄을 추가하지 않은 이전 연구에서 0.67 V/cm의 전기장하에 석탄의 메탄수율은 25.1 mL/g lignite 이었다. 이것은 활성탄이 전기활성 미생물의 DIET에 매개체로서의 기여를 했다는 것을 시사한다. 혐기성 슬러지와 효모 추출물을 보충한 후 최종 메탄수율은 AE67에서 98.0 mL/g lignite이었다. 하지만 정전기장이 0.33 V/cm보다 작은 소화조에서의 누적메탄생성량은 공시료 소화조보다 작았다. 활성탄이 존재하는 생물전기화학 혐기성 소화조에서 0.33 V/cm보다 작은 정전기장에서 석탄의 가수분해는 촉진될 수 있었으나 가수분해 중간생성물의 메탄발효반응은 저해를 받았다. 복합적인 가수분해 및 산발효단계와 메탄발효반응을 포함하는 석탄의 생물학적 메탄전환반응에서 활성탄은 초기단계에 0.33V/cm 보다 큰 전기장세기의 환경에서 매개체 역할을 발현할 수 있다는 것을 시사하며 혐기성 슬러지와 효모 추출물의 보충후 0.67V/cm의 전기장이 전기활성미생물의 DIET를 효과적으로 촉진하여 석탄의 생물학적 메탄전환을 극대화할 수 있음을 입증하였다.

본 논문은 지속가능하고 안정적인 세계 에너지원의 개발을 위한 상업화 가능한 석탄의 환경친화적 메탄전환기술에 대하여 소개하였다. 세계 에너지원의 30%를 차지하고 있는 석탄은 연소하면서 미세먼지를 포함하는 다양한 오염물질을 다량 방출한다. 매장량이 풍부하고 저렴한 석탄의 고품위화 및 청정화 기술의 개발은 매우 매력적이다. 본 연구에서는 최초로 생물전기화학 혐기성 소화조에

의한 석탄의 메탄수율을 조사하였으며 혐기성소화조에 분극 전극을 설치하여 0.67 V/cm의 전기장을 형성함으로써 메탄전환에 기여하는 전기활성미생물을 풍부하게 하였고 석탄의 가수분해를 단계별로 가속화하였으며 DIET 반응을 촉진함으로써 세계 최대의 메탄전환율을 기록하였다. 연구를 진행하면서 석탄의 메탄전환반응을 저해하는 인자를 규명하였고 메탄생성의 율속단계를 완화하는 새로운 기술을 개발하였다. 즉효모 추출물과 혐기성 슬러지의 보충하여 석탄의 가수분해 및 산발효 중간생성물로부터 추가로 메탄을 생성시켜 메탄 수율을 109.9 ± 11 mL/g lignite까지 극대화하였다. 물의 전기분해 및 활성탄이 석탄의 메탄전환과정에 미치는 영향들과 전기장의 세기가 석탄의 가수분해 및 산발효, 메탄전환반응 및 최종 메탄수율에 미치는 영향을 규명하였다. 물의 전기분해는 초기단계에서 석탄의 가수분해를 자극하였으며 활성탄의 추가는 초기단계에서 0.33V/cm의 낮은 전기장에서 미생물의 DIET를 자극하는 것으로 나타났다. 본 논문에서 새롭게 규명된 성과들은 석탄의 메탄전환기술의 실용화를 위한 전환점이 될 것으로 판단된다.

7.2 향후 연구과제

- 1) 효모 추출물로 개질된 석탄은 생물전기화학 혐기성 소화조에서 지체기 없이 메탄을 즉시 생성할 수 있었다. 하지만 현장에서 적용하려면 효모 추출물보다 더 저렴한 생체자극 물질을 탐색할 필요가 있다.
- 2) 석탄의 생물학적 메탄전환은 아직 초기 단계에 있다. 생물전기화학 혐기성 소화조에서 석탄으로부터의 메탄전환은 본 연구에서 처음으로 조사되었다. 메탄전환의 실용화를 위하여 석탄부하량이 증가된 연속반응조의 운전 및 성능평가가 필요하다.
- 3) 새로운 발견을 대규모 상업적 응용에 이전하기 위해서 석탄의 종류에 따른 메탄전환율의 조사가 필요하다.
- 4) Electrochemical Impedance Spectroscopy 측정결과를 보면 고주파에서 Inductance가 발현된다. 생물전기화학 혐기성 소화조에서 전기활성미생물 사이의 종간직접전자전달을 촉진시켜 석탄의 메탄수율을 증진시키기 위하여

Inductance의 성분을 규명할 필요가 있다.

참고문헌

- Bao Y, Huang H, He D, Ju Y, Qi Y. Microbial enhancing coal-bed methane generation potential, constraints and mechanism. *Journal of Natural Gas Science and Engineering* 2018;35:68-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jngse.2016.08.035>.
- Borrel G, Harris HMB, Parisot N, Gaci N, Tottey W, Mihajlovski A, et al., Genome Sequence of “*Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis*” Isoire-Mx1, a Third Thermoplasmatales-Related Methanogenic Archaeon from Human Feces. *Genome Announcements* 2013;1:453-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00453-13>.
- Breckenridge CR, Polman JK. Solubilization of coal by biosurfactant derived from *Candida bombicola*. *Geomicrobiol J* 1994;12:285-8. <https://doi.org/10.1080/01490459409377996>.
- Busch, A., Gensterblum, Y., Krooss, B.M., 2003. Methane and CO₂ sorption and desorption measurements on dry Argonne premium coals: pure components and mixtures. *Int J Coal Geology* 55, 205-224. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-5162\(03\)00113-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-5162(03)00113-7).
- Busch, A., Gensterblum, Y., 2011. CBM and CO₂-ECBM related sorption processes in coal: a review. *Int J Coal Geology* 87, 49-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2011.04.011>.
- Chen W, Westerhoff P, Leenheer JA, Booksh K. Fluorescence Excitation–Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. *Environ Sci Technol* 2003;37:5701-5710. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es034354c>.
- Chun G, Bae D, Nickens K, O’ Brien TJ, Patierno SR, Ceryak S. Polo-like kinase 1 enhances survival and mutagenesis after genotoxic stress in normal cells through cell cycle checkpoint bypass. *Carcinogenesis*

- 2010;31:785-93. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq014>.
- Colosimo F, Thomas R, Lloyd JR, Taylor KG, Boothman C, Smith AD, et al., Biogenic methane in shale gas and coal bed methane: A review of current knowledge and gaps. *Int J Coal Geology* 2016;165:106-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2016.08.011>.
- Coursolle D, Baron DB, Bond DR, Gralnick JA. The Mtr respiratory pathway is essential for reducing flavins and electrodes in *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* 2010;192(2):467-474. <https://doi.org/10.1128/JB.00925-09>.
- Davis KJ, Lu S, Barnhart EP, Parker AE, Fields MW, Gerlach R. Type and amount of organic amendments affect enhanced biogenic methane production from coal and microbial community structure. *Fuel* 2018a;211:600-608. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.09.074>.
- Davis KJ, Gerlach R. Transition of biogenic coal-to-methane conversion from the laboratory to the field: A review of important parameters and studies. *Int J Coal Geology* 2018b;185:33-43. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2017.11.006>.
- Dridi B, Fardeau ML, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Systematic Evolutionary Microbiol* 2012;62:1902-1907. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033712-0>.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., Franson, M.A.H., 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, Denver, Alexandria.
- Fallgren PH, Jin S, Zeng CP, Ren ZY, Lu A, Colberg PJS. Comparison of coal rank for enhanced biogenic natural gas production. *Int J Coal Geology* 2013;115:92-96. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2013.01.014>.
- Feng Q, Song YC, Bae BU. Influence of applied voltage on the performance of bioelectrochemical anaerobic digestion of sewage sludge and

- planktonic microbial communities at ambient temperature. *Bioresource Technology* 2016;220:500–508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.085>.
- Feng Q, Song YC, Ahn Y. Electroactive microorganisms in bulk solution contribute significantly to methane production in bioelectrochemical anaerobic reactor. *Bioresource Technology* 2018a;259:119–127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.039>.
- Feng, Q., Song, Y.C., Yoo, K., Kuppanan, N., Subudhi, S., Lal, B., 2018b. Polarized electrode enhances biological direct interspecies electron transfer for methane production in upflow anaerobic bioelectrochemical reactor, *Chemosphere* 204:186–192.
- Fuertz J, Nguyen V, McLennan JD, Adams DJ, Han KB, Sparks TD. Optimization of biogenic methane production from coal. *Int J Coal Geology* 2017; 183:14–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2017.09.014>.
- Furmann A, Schimmelmann A, Brassell SC, Mastalerz M, Picardal F. Chemical compound classes supporting microbial methanogenesis in coal. *Chemical Geology* 2013;339:226–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.08.010>.
- Gao Y, Ryu H, Rittmann BE, Hussain A, Lee HS. Quantification of the methane concentration using anaerobic oxidation of methane coupled to extracellular electron transfer. *Bioresource Technol* 2017;241:979–984. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.053>.
- Ghosh S, Jha P, Vidyarthi AS. Unraveling the microbial interactions in coal organic fermentation for generation of methane—A classical to metagenomic approach. *Int J Coal Geology* 2014;125:36–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2014.02.005>.
- Green MS, Flanagan KC, Gilcrease PC. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, U.S.A.. *Int J Coal Geology* 2018;76:34–45. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2008.05.001>.

- Guo, H., Zhang, J., Han, Q., Huang, Z., Urynowicz, M.A., Wang, F., 2017. Important role of fungi in the production of secondary biogenic coalbed methane in China's southern Qinshui Basin. *Energy Fuel* 31, 7197-7207. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b00925>.
- Haider R, Ghauri MA, Sanfilipo JR, Jones EJ, Orem WH, Tatu CA, et al., Fungal degradation of coal as a pretreatment for methane production. *Fuel* 2013;104:717-725. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2012.05.015>.
- Harnisch F, Freguia S. A Basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of electroactive microbial biofilms. *Chem Asian J* 2012;7:466-475. <https://doi.org/10.1002/asia.201100740>.
- Harpalani, S., Prusty, B.K., Dutta, P., 2006. Methane/CO₂ sorption modeling for coalbed methane production and CO₂ sequestration. *Energy Fuel* 20, 1591-1599. <http://dx.doi.org/10.1021/ef050434l>.
- Harris SH, Smith RL, Barker CE. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals. *Int J Coal Geology* 2008;76:46-51. <https://doi.org/10.1016/j.coal.2008.05.019>.
- M. Hofrichter and R. M. Fakoussa, in *Lignin, Humic Substances and Coal*, M. Hofrichter and A. Steinbüchel Eds., Wiley-VCH, Weinheim (2001).
- Huang, Z., Urynowicz, M.A., Colberg, P.J.S., 2013a. Stimulation of biogenic methane generation in coal samples following chemical treatment with potassium permanganate. *Fuel* 111, 813-819. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.03.079>.
- Huang, Z., Urynowicz, M.A., Colberg, P.J.S., 2013b. Bioassay of chemically treated subbituminous coal derivatives using *Pseudomonas putida* F1. *Int J Coal Geology* 115, 97-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2013.01.012>.
- Z. Huang, C. Liers, R. Ullrich, M. Hofrichter and M. A. Urynowicz, *Fuel*, 112, 295 (2013).
- Hur, M., Kim, Y., Song, H.R., Kim, J.M., Choi, Y.I., Yi, H., 2011. Effect of

- Genetically Modified Poplars on Soil Microbial Communities during the Phytoremediation of Waste Mine Tailings, *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7611-7619.
- Huser BA, Wuhrmann K, Zehnder AJB. *Methanothrix soehngenii* gen. nov., a new acetotrophic nonhydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiol* 1982;132:1-9. <https://doi.org/10.1007/BF00690808>.
- Jones, E.J.P., Harris, S.H., Barnhart, E.P., Orem, W.H., Clark, A.C., Corum, M.D., Kirshtein, J.D., Varonka, M.S., Voytek, M.A., 2013. The effect of coal bed dewatering and partial oxidation on biogenic methane potential. *Int J Coal Geology* 115, 54-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2013.03.011>.
- Kato S, Hashimoto K, Watanabe K. Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi)conductive iron-oxide minerals. *Environ. Microbiol.* 2012;14:1646-1654.
- Kim YI. Trend for CBM development in Russia, The Conference of The Society of Mineral and Energy Resources Engineers, 2014; 552-553.
- Kim YI. Prospects for Worldwide CBM(Coalbed Methane) Development, *Econ.Environ.Geol.*, 2015; 48:65-75. <http://dx.doi.org/10.9719/EEG.2015.48.1.65>
- Lim SS, Yu EH, Daud WRW, Kim BH, Scott K. Bioanode as a limiting factor to biocathode performance in microbial electrolysis cells. *Bioresource Technol* 2017;238:313-324. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.127>.
- Macalady JL, Lyon EH, Koffman B, Albertson LK, Meyer K, Galdenzi S, et al., Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *App Environ Microbiol* 2006;72:5596-5609. <https://doi.org/10.1128/AEM.00715-06>.
- McGlade, C., Speirs, J., Sorrell, S., 2013. Unconventional gas - a review of regional and global resource estimates. *Energy* 55, 571-584. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2013.01.048>.
- Milewska-Duda, J., Duda, J., Nodzeński, A., Lakatos, J., 2000. Absorption and

- adsorption of methane and carbon dioxide in hard coal and active carbon. *Langmuir* 16, 5458–5466. <http://dx.doi.org/10.1021/la991515a>.
- Moore, T.A., 2012. Coalbed methane: A review. *Int J Coal Geology* 101, 36–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2012.05.011>.
- NEWS & INFORMATION FOR CHEMICAL ENGINEERS, Vol. 34, No. 2, 2016.
- Nzila A. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives. *Environ Pollution* 2018;239:788–802. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.074>.
- Okamoto A, Tokunou Y, Saito J. Cation-limited kinetic model for microbial extracellular electron transport via an outer membrane cytochrome C complex. *Biophysics and Physicobiology* 2016;13:71–76. https://doi.org/10.2142/biophysico.13.0_71.
- Orem WH, Voytek MA, Jones EJ, Lerch HE, Bates AL, Corum MD, et al., Organic intermediates in the anaerobic biodegradation of coal to methane under laboratory conditions. *Organic Geochemistry* 2010;41:997–1000. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.03.005>.
- Patel GB, Dennis sprott G. *Methanosaeta concilii* gen. nov. sp. nov. (“*Methanothrix concilii*”) and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov.. *Int J Systematic Bacteriology* 1990;40:79–82. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-1-79>.
- Patel GB. Characterization and nutritional properties of *Methanothrix concilii* sp. nov., a mesophilic, acetoclastic methanogen. *Canadian J Microbiol* 1984;30:1383–1396. <https://doi.org/10.1139/m84-221>.
- Park SY, Liang Y. Biogenic methane production from coal: A review on recent research and development on microbially enhanced coalbed methane (MECBM). *Fuel* 2016;166:258–267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2015.10.121>.
- Pelletier E, Kreimeyer A, Bocs S, Rouy Z, Gyapay G, Chouari R, et al.,

- ‘ ‘Candidatus Cloacamonas acidaminovorans’ : genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *J Bacteriol* 2008;190 (7):2572–2579. <https://doi.org/10.1128/JB.01248-07>.
- Piao DM, Song YC, Kim DH. Bioelectrochemical Enhancement of Biogenic Methane Conversion of Coal. *Energies* 2018;11:2577. <https://doi.org/10.3390/en1102577>.
- Ritter D, Vinson D, Barnhart E, Akob DM, Fields MW, Cunningham AB, et al., Enhanced microbial coalbed methane generation: A review of research, commercial activity, and remaining challenges. *Int J Coal Geology* 2015;146:28–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2015.04.013>.
- Rotaru AE, Shrestha PM, Liu F, Shrestha M, Shrestha D, Embree M, et al., A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to Methanosaeta for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy Environ Sci* 2014;7:408–415. <https://doi.org/10.1039/C3EE42189A>.
- Ryu HW, Chang YK, Kim SD. Microbial coal desulfurization in an airlift bioreactor by sulfur-oxidizing bacterium thiobacillus ferrooxidans. *Fuel Processing Technology* 1993;36:267–275. [https://doi.org/10.1016/0378-3820\(93\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0378-3820(93)90036-4).
- Bernhard Schink. Syntrophic associations in methanogenic degradation. In: Overmann, P.D.J. (Ed.), *Molecular Basis of Symbiosis, Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005, pp. 1–19. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-28221-1_1.
- Senthamaraiikkannan G, Gates I, Prasad V. Multiphase reactive-transport simulations for estimation and robust optimization of the field scale production of microbially enhanced coalbed methane. *Chemical Engineering Science* 2016;149:63–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2016.04.017>.
- Shen L, Zhao Q, Wu X, Li X, Li Q, Wang Y. Interspecies electron transfer in

- syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors. *Renew. Sust. Energy Rev.* 2016;54:1358-1367.
- Song YC, Kwon SJ, Woo JH. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water Research* 2014;38:1653-1662. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.019>.
- Strapoc D, Mastalerz M, Dawson K, Macalady J, Callaghan AV, Wawrik B, et al., Biogeochemistry of Microbial Coal-Bed Methane. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 2011;39:617-656. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2016.04.017>.
- Strapoć, D., Mastalerz, M., Dawson, K., Macalady, J., Callaghan, A.V., Wawrik, B., Turich, C., Ashby, M., 2011. Biogeochemistry of microbial coal-bed methane. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 39, 617-656. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-earth-040610-133343>.
- U.S. Energy Information Administration, 2017a. Natural Gas - U.S. Energy Information Administration (EIA) [WWW Document]. Nat. Gas URL. <http://www.eia.gov/naturalgas/> (accessed January 13, 2017).
- U.S. Energy Information Administration, 2017b. Coal - U.S. Energy Information Administration (EIA) [WWW Document]. Coal URL. <https://www.eia.gov/coal/> (accessed June 17, 2017).
- Wang L, Pan Z, Xu H, Wang C, Gao L, Zhao P, et al., The influence of nitrogen fertiliser rate and crop rotation on soil methane flux in rain-fed potato fields in Wuchuan County, China. *Sci Total Environ* 2015;537:93-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.003>.
- Wang B, Tai C, Wu L, Chen L, Liu JM, Hu B, et al., Methane production from lignite through the combined effects of exogenous aerobic and anaerobic microflora. *Int J Coal Geology* 2017;173:84-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2017.02.012>.
- Yi L, Feng J, Qin YH, Li WY. Prediction of elemental composition of coal

- using proximate analysis. *Fuel* 2017;193:315–321. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.12.044>.
- Yuan Y, Zhao B, Zhou S, Zhong S, Zhuang L. Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells. *Bioresour Technol* 2011;102(13):6887e91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.008>.
- Zellner G, Alten C, Stackebrandt E, Conway de Macario E, Winter J. Isolation and characterization of *Methanocorpusculum parvum*, gen. nov., spec. nov., a new tungsten requiring, coccoid methanogen. *Archives of Microbiol* 1987;147:13–20. <https://doi.org/10.1007/BF00492898>.
- Zhang J, Park S, Liang Y, Harpalani S. Finding cost-effective nutrient solutions and evaluating environmental conditions for biogasifying bituminous coal to methane ex-situ. *Applied Energy* 2016a;165:559–568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.12.067>.
- Zhang J, Liang Y, Harpalani S. Optimization of methane production from bituminous coal through Biogasification, *Applied Energy* 2016b;183:31–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.08.153>.
- Zhang J, Liang Y. Evaluating approaches for sustaining methane production from coal through biogasification. *Fuel* 2017;202:233–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.04.037>.
- Zhang J, Anderson K, Britt D, Liang Y. Sustaining biogenic methane release from Illinois coal in a fermentor for one year. *Fuel* 2018;227:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.061>.
- Zheng H, Chen T, Rudolph V, Golding SD. Biogenic methane production from Bowen Basin coal waste materials. *Int J Coal Geology* 2017;169: 22–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coal.2016.09.006>.