

혐기성 미생물을 이용한 수소생산에 있어서 기질농도 및 수리학적 체류시간의 영향

고인범[†] · 신항식 · 이용두*

한국과학기술원 건설및환경공학과 · *제주대학교 토목환경공학전공

(2006년 7월 10일 접수, 2006년 9월 11일 채택)

Influence of Substrate Concentration and Hydraulic Retention Time on the Hydrogen Production Using Anaerobic Microflora

In-Beom Ko[†] · Hang-Sik Shin · Yong-Doo Lee*

Department of Civil and Environmental Engineering, KAIST · *Major of Civil and Environmental Engineering, Cheju National University

ABSTRACT : The influence of substrate concentration and hydraulic retention time(HRT) on the hydrogen production by anaerobic microflora was investigated by conducting three series of continuous experiments the individual influences of substrate concentration and HRT. In series I, substrate concentration was increased from 3 to 27 g-glucose/L keeping HRT at 8 hr. Series II and III carried out same condition with series I at HRT of 16 hr and 24 hr, respectively. The effects of HRT and substrate concentration on the hydrogen production yield were analyzed by quadratic model. The maximum hydrogen production yield of 2.05 mol H₂/mol glucose was found at the HRT of 9.6 hr and the substrate concentration of 15.4 g/L. The relationship between HRT and substrate concentration on hydrogen production yield as displayed a saddle shape in the response surface plot. Optimum HRT and substrate concentration are observed at in the range of 5 and 14 hr, at between 13 and 17 g/L, respectively, for the hydrogen production yield being 2 mol H₂/mol glucose. The concentrations of organic acids increased with the increase of the amount of glucose consumption. Acetic acid and butyric acid were the main by-products from the glucose degradation.

Key Words : Anaerobic Microflora, Hydrogen Production, HRT, Organic Acid

요약 : 혐기성 미생물에 의한 수소 생산에 있어서 기질 농도와 HRT의 영향에 대하여 3계열로 구분하여 실험을 수행하였다. 계열 I은 HRT가 8시간에서 기질농도를 3에서 27 g-glucose/L로 증가시키면서 실험을 수행하였고, 계열 II는 HRT가 16시간, 계열 3은 HRT가 24 시간으로 설정하여 실험을 수행하였다. 연구결과, 수소 생성 수율에 미치는 HRT와 기질 농도의 영향에 대하여 표면분석법에 의하여 분석하였다. 최대 수소 생성 수율은 기질농도 15.4 g/L 및 HRT 9.6시간에서 2.05 mol H₂/mol 글루코오스의 값을 구할 수 있었다. 2 mol H₂/mol 글루코오스의 수소 생성 수율을 얻기 위한 기질농도 및 HRT는 각각 13~17 g/L 및 5~14시간임을 알 수 있었다. 글루코오스의 소모에 따라 유기산의 농도는 증가하였고, 주요 대사산물은 아세트산과 부틸산이었다.

주제어 : 혐기성 미생물, 수소생산, HRT, 유기산

1. 서 론

유기물을 이용한 생물학적 수소생산은 광합성 세균에 의한 광합성 수소생산과 혐기성 산생성 세균의 발효에 의한 수소생성으로 크게 구분할 수 있다. 산생성 세균을 이용하는 수소생성은 많은 에너지를 필요로 하지 않고, 높은 속도로 수소생성이 가능하기 때문에 경제적인 방법의 하나로서 연구가 진행되고 있으나, 산생성 세균에 의한 수소생성과 함께 유기산이 생성되기 때문에 단독으로는 유기성 폐기물 처리 시스템으로서 성립되지 않고, 후속 처리를 필요로 한다. 한편, 광합성세균은 유기산 등을 수소와 이산화탄소로 분해하는 폐수처리의 최종단계 기능을 가지고 있다.

산생성 세균에 의한 수소생성에 대하여, Yu 등¹⁾은 배양 온도가 높을수록 수소 생성량이 증가하고, 최적 온도는 55℃였다고 보고하고 있다. Tanisho 등²⁾은 온도의 상승과 함께 수소 생성 속도가 증가해 40.5℃에서 최대 수소 생성 속도를 얻었다. 한편, 神戶 등³⁾은 배양 온도가 낮을수록 수소 발생 비율이 증가해, 25℃에서 수소 생성량이 최대가 되었다고 보고하고 있고, 遠藤 등⁴⁾도 혐기성 소화에 있어서 수소 가스의 생성은 40℃ 이하에서 볼 수 있었고, 온도가 낮을수록 수소 생성량이 증가했다고 보고하고 있다. Brosseau 등⁵⁾은 37℃에서 최대 수소 생성 속도를 나타내었다고 보고하였다. 이와 같이 최적인 배양 온도에 관해서 연구자에 따라 다양한 결과가 보고되고 있는데, 이러한 결과는 각각의 실험에 이용한 미생물 및 균상이 다른 것을 들 수 있고, 또한 배양 온도가 높을수록 균체의 증식이나 고분자 화합물의 분해가 촉진되는 것이 알려져 있지만, 수소 생산에 있어서는 미생물 증식

[†] Corresponding author

E-mail: inbeomko@hotmail.com

Tel: 042-869-3697

Fax: 042-869-3610

과의 균형이나 기질 대사 형태의 변화 등 복잡한 기구가 관여한다고 생각되며, 미생물이나 기질의 종류 및 농도에 의해 차이가 생길 가능성이 있다. 또한, 수소생성조의 온도는 후속 처리공정을 고려하여 온도로 설정하는 것이 유기성 폐기물 처리 시스템을 구성하는데 유리할 것으로 생각된다.

Yu 등¹⁾은 혼합 미생물을 이용한 수소생성에 있어서, pH 5.5에서 가장 높은 수소 생산량을 얻었고, Zoetemeyer 등⁶⁾은 pH 5.7~6.0, Tanisho 등²⁾은 pH 6.5에서 관측되었고, pH 7.0에서는 균체의 증식은 양호하나, 수소 생산은 극단적으로 저하했다고 보고하고 있다. 佐藤 등⁷⁾은 수소생산량 및 생산속도 모두 pH 5.0일 때 최대가 되었다고 보고하고 있다. 지금까지의 연구보고에 의하면, 수소 생산량은, pH가 5.5 부근에서 최대값을 나타냄을 알 수 있으며, pH가 중성 부근에 가까워질수록 미생물의 증식이 우선됨을 알 수 있고, 또한 낮은 pH조건에서는 균체의 생육이 억제되고, 대사경로의 변경을 초래한다고 알려져 있다. 이처럼 각각의 연구에서는 수소 생성 조건이 다양하게 보고하고 있는데, 이러한 원인으로는 실험에 이용된 미생물의 종류 및 유기물의 종류 등이 다르기 때문으로 생각된다. 또한, 회분실험에 있어서, 투입한 종균에 의해 행해지는 대사경로가 한정 될 뿐만 아니라, 배양 환경 중의 유기물 농도나 유기산 농도가 시간과 함께 변화하기 때문에, 일반성이 낮은 사례 연구법이 되기 쉽다. 보다 보편적으로 일반성 있는 식견을 얻기 위해서는, 혼합 미생물군을 이용한 연속 실험을 통하여 기질의 대사경로나 수소생산이 어떻게 안정되는 것인가에 대해서 파악할 필요가 있다.

한편, 성공적인 수소생성을 위한 HRT는 일반적으로 8~12시간이 보고되고 있으나,^{1,8-10)} 기질 농도에 대한 연구결과는 단일 미생물의 순수배양에서 보고되고 있으나,¹¹⁾ 혼합계의 연속배양에 대한 결과는 거의 보고 되지 않는 실정이다.

본 연구에서는 수소생성 혐기성 미생물을 이용한 수소생산에 있어서 기질농도 및 수리학적 체류시간(HRT)이 수소생성에 미치는 영향과 부산물 생성 특성에 대하여 연속실험을 통하여 고찰을 행하였다.

2. 실험

2.1. 실험방법

수소생성 혐기성 미생물로는 대두저장고 폭발사고를 일으킨 장소에서 채취한 슬러지를 이용하여 실험에 이용하였으며, 기본배지에 글루코오스 10 g/L, NH₄Cl 1.6 g/L 및 글루타민산 나트륨 1.69 g/L를 첨가하여 pH 5.5조건에서 온도 35℃에서 연속 배양하였다. 사용된 기본배지는 K₂HPO₄ 1.83 g, MgSO₄·7H₂O 0.12 g, ZnSO₄·7H₂O 0.24 g, MnSO₄·4H₂O 2.1 mg, FeSO₄·7H₂O 10 mg, Cu(NO₃)₂·3H₂O 0.04 mg, CaCl₂·2H₂O 10 mg, CoCl₂·7H₂O 0.1 mg, NiCl₂·7H₂O 0.02 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.75 mg, H₃BO₃ 2.8 mg, EDTA·2Na 20 mg, Thiamine-HCl 1 mg, p-aminobenzoate 0.015 mg, Nicotinamide 0.015 mg, Biotin 0.015 mg and Nicotinic acid 1 mg을 포함한다.

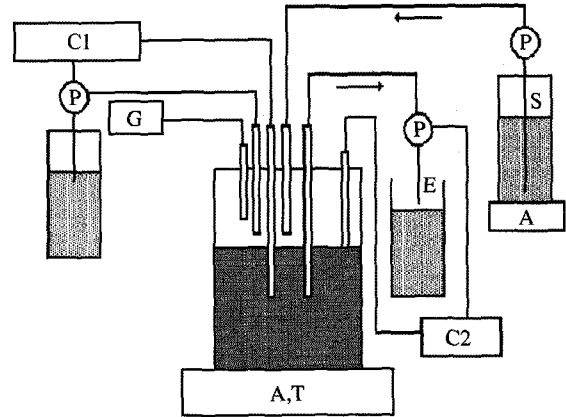


Fig. 1. Schematic diagram of experimental set-up used for the hydrogen production by anaerobic hydrogen producing microflora. (A: Agitator, C1: pH controller, C2: Water level controller, E: Effluent, G: Gas counter, P: Pump, S: Substrate, T: Temperature controller)

본 실험에 이용된 슬러지에는 PCR-DGGE법에 의하여 미생물 군집을 조사한 결과, *Bacillus circulans*, *Oscillospira guilliermondii*, *Propionispora hippei*, *Clostridium acetobutylicum* 등이 존재하는 것으로 조사되었다.¹²⁾

본 연구에 이용된 실험장치는 Fig. 1에 나타낸바와 같이 투명 아크릴원통(I.D 125 mm)을 이용하여 제작하였으며, 유효용량은 500 mL이다. 반응조의 온도는 수소생성 반응 후속 단계로 메탄생성 반응을 고려하여 35℃로 설정하였으며, pH 5.5 조건에서 실험을 수행하였다. 실험은 기질농도 및 HRT의 조건이 다른 3계열로 수행하였다. 계열 I에서는 HRT가 8시간의 조건에서 기질농도를 3~27 g/L의 범위에서 증가시키면서 실험을 수행하였고, 계열 II에서는 계열 I과 동일한 기질농도 조건에서 HRT를 16시간으로 조절하여 실험을 수행하였으며, 계열 III에서는 HRT를 24시간으로 조절하여 기질농도가 수소생산에 미치는 영향을 파악하기 위하여 실험을 수행하였다. 실험결과의 정리는 각 조건에서 HRT의 30배가 경과한 시점에서 약 10일간의 데이터를 수집한 평균치를 대푯값으로 나타내었다. 수소생성속도는 일일 6번 측정하여 그 평균값을 대푯값으로 나타내었다.

2.2. 분석방법

생산된 가스 중 수소의 함량은 열전도 검출기(TCD)가 장착된 가스크로마토그래피(GC, Shimadzu 8A, Japan)로, 주입부, 오븐 및 검출부의 온도는 각각 100, 70 및 100℃로 조절하였으며, 컬럼은 Porapak Q(50/80 mesh)이 충전된 2 m의 스테인리스 컬럼을 이용하였고, 캐리어 가스로는 질소가스를 이용하여 30 mL/min의 조건에서 분석을 행하였다.

휘발성 유기산(VFA) 농도는 capillary 전기 영동 분석기(Photal, CAPI-3200)를 이용하여 분석하였다. 측정은 capillary 컬럼(ID75 um×805 mm, EL680 mm)을 이용하여 온도 25℃, 전압 -25 kV의 조건으로 210 nm(indirect UV검출)에서 행하였다.

발효공정과 같은 생물학적 영역에서 진행되는 현상에 대한 기본이해가 부족하여 적절한 수식으로 표현하기가 힘든 경우가 많다. 이러한 경우에는 오히려 실험식과 통계적인 방법을 결합한 표면분석법을 이용하는 것이 유리하다.¹³⁾ 본 연구에서는 기질의 농도와 HRT가 수소생성 수율에 미치는 영향을 식 (1)과 같은 2변수, 2차식으로 분석하였다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

여기서, Y는 추정값, X₁과 X₂는 독립변수, β₁과 β₂는 선형 계수, β₁₁과 β₂₂는 이차항 계수, β₁₂는 상호작용 계수.

식 (1)의 모든 변수는 통계 소프트웨어 ISP(s-link(주)사, 한국)를 이용하여 구했다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 수소생성

글루코오스와 같은 미생물이 이용하기 쉬운 기질은 수 시간의 체류시간으로 충분히 수소를 생성할 수 있으며, 일반적으로 체류시간이 짧을수록 수소생성속도는 증가하는 경향을 나타내나, 기질의 분해율은 감소한다.

본 연구에서 각각의 계열의 실험결과를 Table 1에 나타내었다. 기질의 농도가 증가할수록 수소생산 속도도 증가하는 경향을 나타내었으며, 계열 I에서 0.39~11.29 L/L/d의 범위를 나타냈고, 계열 II에서는 0.1~6.55 L/L/d를 나타냈으며, 계열 III에서는 0.76~3.14 L/L/d를 나타내었다. 각각의 계열에서, 기질농도가 4.5 g/L 이하에서는 수소생성 속도는 아

주 적은 값을 나타내었다. 수소생성 수율은, 계열 I에서 기질농도가 4.5 g/L일 때 1.6 mol H₂/mol glucose에서 13.5 g/L일때 2.01 mol H₂/mol glucose로 증가하였으나, 기질농도가 27 g/L에서는 1.12 mol H₂/mol glucose로 감소하는 경향이 나타났으며, 계열 II와 III에서도 마찬가지로 경향이 나타남을 알 수 있었다.

沈 등⁸⁾은 HRT를 3~27시간 사이에서 7단계로 설정하고 여러 가지 기질을 이용하여 연속적인 수소생성에 대하여 실험을 행한 결과, Glucose와 Starch는 HRT 6시간에서, Lactose와 Sucrose에서는 HRT가 8시간일 때, 수소생성 수율은 최대가 되었다고 보고하고 있으며, Yu 등¹⁾은 혼합미생물을 이용한 주정 제조폐수에서의 연속적인 수소생성 실험결과 HRT 24시간에서 가장 높은 수소생성수율 2.14 mol H₂/mol hexose를 얻었다. Ueno 등⁹⁾은 폐당액에서 수소를 생산하기 위한 실험에서 HRT를 변화시켜 실험한 결과, HRT가 짧을수록 수소생산이 높았고, HRT가 길수록 유기물 제거효율이 높은 결과를 얻었으며, HRT가 12시간에서 2.6 mol H₂/mol hexose의 수율을 얻었다. 지금까지 보고된 결과들과 본 연구결과를 토대로 수소생성 속도는 기질의 투입속도가 크게 되는 짧은 HRT에서 커짐을 알 수 있다. 그러나 수소생성수율을 높이기 위해서는 기질농도에 따라 일정한 체류시간을 확보할 필요가 있다.

기질의 농도와 HRT가 수소생성 수율에 미치는 영향에 대하여 표면분석법을 적용한 결과는 식 (2)와 Fig. 2에 나타내었다.

$$Y = -0.0087 + 0.2389X_1 + 0.0411X_2 - 0.0072X_1^2 - 0.001X_2^2 - 0.0014X_1X_2 \quad (2)$$

(R² = 0.5732, F = 2.95)

Table 1. Characteristics of hydrogen production in each experiment conditions

HRT	Concentration of glucose(g/L)	H ₂ production rate(mL/L/d)	H ₂ production yield (mol H ₂ /mol glucose)	Cell (mg protein/L)	Removal rate of Glucose(%)
8 hr (series I)	3.0	0.39	0.35	257	100.0
	4.5	2.69	1.60	410	100.0
	6.8	4.38	1.74	556	100.0
	9.0	6.65	1.98	775	100.0
	13.5	10.13	2.01	996	100.0
	18.0	10.48	1.56	925	95.4
	27.0	11.29	1.12	939	73.1
16 hr (series II)	3.0	0.10	0.17	244	100.0
	4.5	1.26	1.50	364	100.0
	6.8	2.12	1.68	493	100.0
	9.0	3.23	1.92	666	100.0
	13.5	4.99	1.98	988	100.0
	18.0	6.12	1.82	1021	100.0
	27.0	6.55	1.30	994	90.9
24 hr (series III)	4.5	0.76	1.36	279	100.0
	9.0	2.02	1.80	476	100.0
	18.0	3.14	1.40	582	91.1

여기서, Y는 수소생성 수율(mol H₂/mol glucose), X₁은 기질농도(g/L), X₂는 HRT(hr).

계산된 R²값이 0.5732로 기질농도와 HRT가 수소생성 수율에 영향을 미치는 상관관계가 있음을 알 수 있다. Fig. 2에서 수소생성 수율은, 기질농도가 일정한 경우에 HRT의 변화에 크게 영향을 받지 않음을 알 수 있으나, HRT가 일정한 경우에는 기질농도에 따라 적정기질 농도에서 최댓값의 수소생성 수율을 나타내고, 기질농도의 증가와 감소에 의하여 크게 변화함을 알 수 있다. 수소생성 수율이 최대값은 기질농도와 HRT가 각각 15.4 g/L와 9.6 hr일때, 2.05 mol H₂/mol glucose를 나타냄을 알 수 있다. 또한, 2 mol H₂/mol glucose 이상의 수소생성 수율을 얻기 위한 기질농도 및 HRT는 각각 13~17 g/L의 범위와 5~14 hr의 범위임을 알 수 있다.

3.2. 기질분해 및 유기산 생성

일반적으로 수소생성 미생물은 대사산물로서 에탄올, 부탄올, 젖산이 생성될 때는 수소를 생성하지 않는 것으로 알려져 있다. 대사산물은 동일한 세균을 이용한 실험에서도 환경 조건에 따라 변하기 때문에 수소생성에 적합한 조건을 만들어 줄 필요가 있다. *C. pasteurianum*는 수소와 유기산을 생성하는 대표적인 세균으로 알려져 있으나, 12.5% 이상의 글루코오스 혹은 철이 제한된 조건에서는 대사경로가 수소생성에서 용매생성으로 전환된다.¹⁴⁾ *C. acetobutyricum*은 용매(아세톤, 부탄올, 에탄올)를 생성하는 대표적인 *Clostridium*속

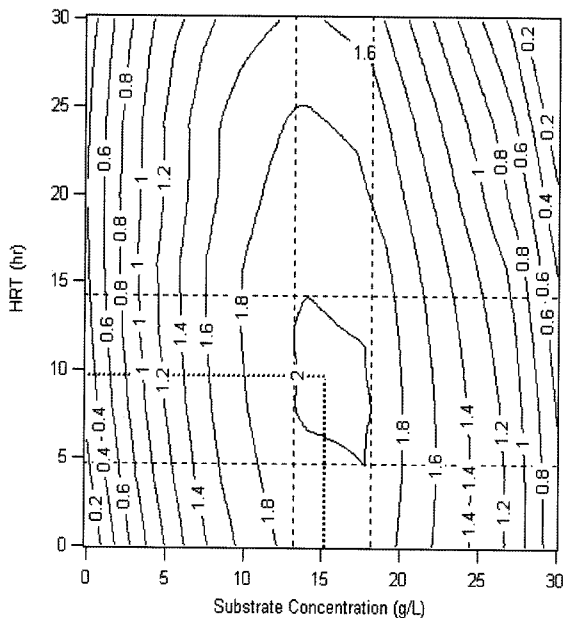


Fig. 2. Contour lines of hydrogen production yield(mol H₂/mol glucose) as a function of HRT and substrate concentration. Dotted lines(···) and dashed lines(--) indicate the optimum conditions and accepted conditions, respectively.

세균으로 알려져 있으나, 용매생성에 적합한 조건은 pH가 5이하, 인과 철 성분이 제한될 경우로 pH가 5이상, 인과 철 성분이 제한되지 않을 정도의 농도와 12.5% 이하의 글루코오스 농도에서는 높은 수소생성 효율을 나타낸다. pH와 HRT 등의 환경인자는 균체의 증식과정에 있어서 대사산물에 큰 영향을 미친다. *Clostridium*속세균은 대수증식기에 유기산과 수소를 생성하고, 정상시에는 알코올을 생성한다.¹⁵⁾ 또한 열처리를 행한 슬러지를 이용하여 셀룰로오스의 회분적 수소생성 실험에서는 알코올 생성이 수소/유기산 생성이 피크점을 경과한 시점에서 발생됨을 알 수 있었다.¹⁶⁾

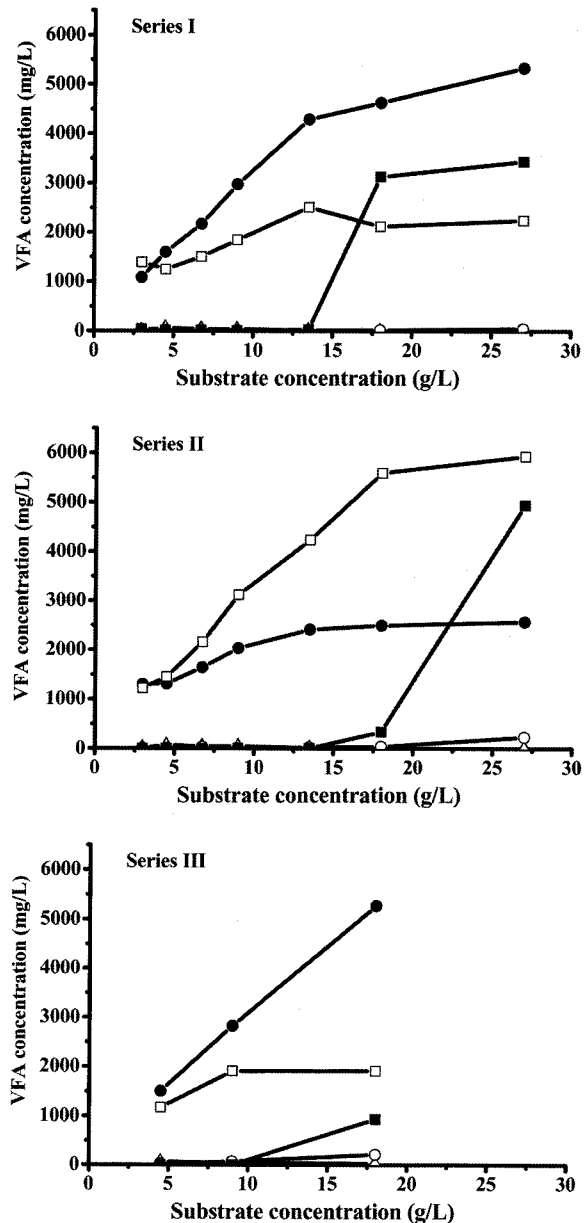


Fig. 3. Variation of Organic acid concentration in each experiment conditions. Symbols: acetic acid(□), butyric acid (●), propionic acid(○), formic acid(△), lactic acid(■)

Table 2. COD mass balance of each series experiment

Series	Glucose(g/L)	COD(%)							
		Glucose	H ₂	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid	Cell	Unknown
I	3.0	-	2.1	32.2	0.1	42.8	0.9	13.0	8.9
	4.5	-	10.5	21.4	0.4	46.9	0.3	13.0	7.5
	6.8	-	12.4	18.7	0.1	45.9	0.2	12.9	9.8
	9.0	-	14.7	17.9	0.3	49.2	0.1	12.8	5.0
	13.5	-	15.5	16.9	0.1	49.4	0.2	12.1	5.8
	18.0	4.2	12.2	11.0	0.1	40.9	16.2	9.8	5.6
	27.0	25.6	9.0	7.9	0.2	32.1	12.1	6.3	6.8
II	3.0	-	1.0	30.1	0.1	48.3	0	11.5	9.0
	4.5	-	10.0	22.6	0.2	42.6	0	11.9	12.7
	6.8	-	12.0	20.4	0.5	45.6	0	11.8	9.7
	9.0	-	14.2	19.7	0.1	51.6	0	11.3	3.1
	13.5	-	15.2	16.3	0.2	48.7	0	11.5	8.1
	18.0	-	14.3	12.9	0.3	49.4	1.8	10.0	11.3
	27.0	8.7	10.4	9.1	1.2	35.7	17.5	7.3	10.1
III	4.5	-	9.1	20.2	0.5	44.1	0	11.9	14.2
	9.0	-	13.8	18.5	0.9	46.7	0	11.9	8.2
	18.0	8.3	11.0	9.9	1.5	46.5	4.8	6.3	11.7

본 연구에서는 기질로 사용된 글루코오스는 농도가 18 g/L 이상의 경우를 제외하고는 100% 소모됨을 알 수 있고, 기질의 소모와 함께 유기산의 농도가 증가함을 알 수 있었다. 생성된 유기산 중 아세트산과 부틸산이 주요 대사산물로 생성되는 것을 알 수 있고, 기질농도가 증가함에 따라 아세트산보다 부틸산 농도가 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3, Table 2). 한편, 기질농도가 높고, HRT가 짧을수록 기질 분해율이 낮아지고, 젖산이 많이 생성됨을 알 수 있다. 이러한 현상은 수소생성 미생물이 유기물 부하가 증가함에 따라 정상적인 수소생성 반응보다, 수소를 생산하지 않는 젖산발효과정으로 대사경로의 변경에 기인한 것으로 판단된다(Table 2).

4. 결론

수소생성 혐기성 미생물을 이용한 수소생산에 있어서 기질농도 및 HRT가 수소생산에 미치는 영향과 부생성물 생산 특성에 대하여 연속실험을 통하여 고찰을 행한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) 수소생성 수율은, 기질농도가 일정한 경우에 HRT의 변화에 크게 영향을 받지 않음을 알 수 있으나, HRT가 일정한 경우에는 기질농도에 따라 적정기질 농도에서 최댓값의 수소생성 수율을 나타내고, 기질농도의 증가와 감소에 의하여 크게 변화함을 알 수 있었다.
- 2) 기질의 농도와 HRT가 수소생성 수율에 미치는 영향에 대하여 표면분석법을 적용한 결과, 수소생성 수율이 최댓값은 기질농도와 HRT가 각각 15.4 g/L와 9.6 hr일때, 2.05 mol

H₂/mol glucose이었고, 기질농도 및 HRT를 각각 13~17 g/L의 범위와 5~14 hr의 범위로 조절함으로써 2 mol H₂/mol glucose 이상의 수소생성 수율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

3) 수소생성 미생물을 이용한 수소생성에서, 유기물 부하가 증가함에 따라 정상적인 수소생성 반응보다, 수소를 생산하지 않는 발효과정으로 대사경로가 변경됨을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., and Zhang, H., "Hydrogen Production from Rice Winery Wastewater in an Up-flow Anaerobic Reactor by Using Mixed Anaerobic Culture," *International of Hydrogen Energy*, **27**, 1359~1365 (2002).
2. Tanisho, S., Suzuki, Y., Wakao, N., "Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E-82005," *J. Hydrogen Energy*, **12**(9), 623~627(1987).
3. 神戸 宏, 中村 玄正, 松本順一郎, "嫌氣性處理におけるグルコースの酸生成分解過程と細菌群に関する基礎的研究-溫度の影響-", *下水道協會誌論文集*, **29**(339), 22~30(1992).
4. 遠藤 銀朗, 野池 達也, 松本順一郎, "嫌氣性消化の酸生成相に及ぼす溫度とpHの影響-", *土木學會論文集*, **330**, 49~57(1983).
5. Brosseau, J. D., Margarits, A., Zajic, J. E., "The effect of temperature on the growth and hydrogen production by

- Citrobacter intermedius," *Biotechnology Letters*, **3**(5), 307~312(1982).
6. Zoetemeijer van den, Heuvel, J. C., Cohen, A., "pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester," *Water Research*, **16**, 303~311(1982).
 7. 佐藤 靖敏, 円谷 輝美, 佐藤 洋一, 中村 玄正, "複合基質からの嫌気性水素発酵におけるpHとHRTの影響について," 土木學會第54回年次學術講演會講演集, pp. 394~395(1999).
 8. 沈 建權, 李 玉友, 野池 達也, "嫌気性細菌による糖類排水の水素発酵特性の比較," 土木學會論文集, **522**(VII-1), 23~31(1996).
 9. Ueno, Y., Otsuka, S., and Morimoto, M., "Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora," *Journal of fermentation and bioengineering*, **79**(4), 395~397(1995).
 10. Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., and Hussy, I., "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation," *Int. J. of hydrogen energy*, **27**, 1339~1347(2002).
 11. Perego, P., Fabiano, B., Ponzano, G. P., and Palazzi, E., "Experimental study of hydrogen kinetics from agroindustrial by-product: Optimal conditions for production and fuel cell feeding," *Bioprocess Engineering*, **19**, 205~211(1998).
 12. 登坂 充博, "PCR-DGGE法を用いた水素発酵微生物群集の構造解析," 東北大學修士論文(2003).
 13. Dabrock, B., Bahl, H., Gottschalk, G., "Parameters affecting soiment production by *Clostridium pasteurianum*," *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(4), 1233~1239(1992).
 14. Yong, K., Yu, Y., and Hwang, S., "Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation," *Water Research*, **37**, 2467~2477(2003).
 15. Lay, J. J., Lee, Y. J., Noike, T., "Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid," *Water Research*, **33**(11), 2579~2586(1999).
 16. Lay, J. J., "Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose," *Biotechnology and Bioengineering*, **74**(4), 280~287(2001).