

하수슬러지로부터 분리된 혐기세균에 의한 수소생산 최적화

오유관*, 김미선*[†]

*한국에너지기술연구원 바이오에너지연구센터

Optimization of Hydrogen Production Using the Mixed Microflora Isolated from Sewage Sludge

YOU-KWAN OH*, MI-SUN KIM*[†]

*Bioenergy Research Center, Korea Institute of Energy Research,
71-2 Jang-dong Yuseong-gu Daejeon 305-343, Korea

ABSTRACT

Fermentative H₂ production was studied using microbial consortia isolated from heat-treated (90 °C, 20 min) sewage sludge. Important parameters investigated were carbon(C) and nitrogen(N)-sources, C/N ratio, phosphate concentration, pH and temperature during anaerobic cultivation in serum bottles. Starch, ribose, sucrose and glucose were good C-sources for the culture growth and H₂ production. Yeast extract was better N-source than (NH₄)₂SO₄ or peptone when individually added to the synthetic media, however the combination of above three N-sources exhibited the additional effect for cell growth and H₂ evolution. Addition of 100 mM phosphate as a buffering agent prevented the rapid pH drop during the cultivation. The optimum initial pH for the cell growth was at 7.0, whereas H₂ production was observed at pH 5.5. Optimum temperature for the cell growth and H₂ production was 37 °C. Initial C/N ratio of 1.22 in the media using glucose and yeast extract as the C- and N-sources, respectively, showed the H₂ yield 1.0 mol H₂/mol glucose.

KEY WORDS : hydrogen production(수소생산), anaerobic fermentative bacteria(혐기발효미생물), optimization(최적화), carbon/nitrogen ratio(탄소원/질소원 비율), hydrogen production yield(수소생산수율)

1. 서 론

장기적인 화석연료 사용으로 배출되는 환경오염물질로 인해 지구온난화와 같은 환경오염문제와

아울러 지구는 화석연료의 고갈이라는 위기에 직면해 있다. 이에 대비하여 신·재생 에너지개발에 관한 연구가 수행되고 있으며, 화석에너지를 대체할 이상적인 연료로 수소에너지에 대한 관심이 고조되고 있다. 수소는 현재 천연가스의 수증기 개질 반응에 의해 주로 생산되고 있으나, 적극적인 화석연료 사용 감축과 재생에너지의 개발을 목적으로

[†]Corresponding author : bmmskim@kier.re.kr

최근에는 미생물을 이용한 생물학적 수소생산 기술이 활발히 연구되고 있다¹⁾.

생물학적 수소생산은 크게 빛을 이용하는 광합성 물분해 및 광합성 발효와 빛을 이용하지 않는 혐기 발효로 나눌 수 있다. 혐기발효의 경우 광합성 물분해 및 광합성 발효 보다 수소생산속도가 빠르고 수소생산 원료물질로 고농도 유기성 폐기물을 이용할 수 있으므로 대체 청정에너지 생산 측면뿐만 아니라 유기성 폐기물 처리 및 CO₂ 저감 등 환경적 측면에서도 많은 관심을 끌고 있다²⁻⁴⁾.

혐기발효의 경우 이론적으로 포도당 한 분자부터 각각 2 분자의 CO₂와 acetate가, 그리고 동시에 4 분자의 H₂가 생성될 수 있다. 그러나 실제로는 CO₂와 acetate 외에 butyrate, lactate 등의 유기산과 알코올 등 다른 발효산물이 생성되어 수소생산 수율이 떨어진다. 또한 외부 발효조건의 영향으로 혐기발효에 의한 수소생산 효율은 이론적인 효율인 4 mol H₂/mol glucose 보다 훨씬 낮은 것으로 보고되고 있다⁵⁾. 이와 같은 낮은 효율은 발효조건을 최적화함으로써 증가하는 경향을 나타내고 있다. 즉, 발효 중 pH 조절⁶⁻⁸⁾, HRT (hydraulic retention time) 최적화⁹⁾, 기질 농도^{10,11)}, C/N 비율¹²⁾, 효율적인 생물반응기 개발¹³⁾ 등 다양한 연구가 활발히 진행되었다. 그러나 대부분의 연구는 *Clostridium*, *Enterobacter* 등과 같은 순수 미생물을 이용하였고, 이 경우 scale-up이 힘들고 외부 원료물질에 포함되어 있는 미생물들에 의해 쉽게 오염될 수 있으므로 실제 수소생산 공정에 적용하기 힘든 단점이 있다. 혼합 미생물을 이용할 경우 혼합미생물의 분리원, 수소생산미생물 농축을 위한 전처리방법, 미생물 분포 등에 따라 수소생산을 위한 최적 환경 및 영양조건(온도, pH, 배지조성 등)이 매우 다를 수 있으므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구에서는 대전시 하수슬러지 처리시설에서 수집한 하수슬러지로부터 혐기 수소생산 미생물을 얻고, 이 미생물 복합체로부터 수소생산을 최적화하기 위하여 탄소원, 질소원, 탄소원/질소원 비율, 온도, pH, 인산염 농도에 의한 완충 효과를

실험실 규모에서 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 전처리 및 발효조건

대전시 하수슬러지 처리시설로부터 수집한 하수슬러지로부터 수소를 생산하는 혐기성 미생물을 분리하기 위하여 90°C에서 20분 간 열처리 하였다. 열처리 후 5번 이상 계대 배양 하여 안정된 미생물 복합체를 확보하였고 이후 seed로 사용하였다. Serum bottle(volume 150 mL, working volume 50 mL)에 seed를 10%로 접종하고, 고무마개와 알루미늄 덮개로 밀폐하여 아르곤 가스(99.999%)로 bottle 내의 공기를 치환하여 혐기조건을 만든 후 37°C에서 6~7 시간 동안 배양하였다. 배양한 미생물은 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 수확하였다. 이후 탄소원의 영향을 실험하기 위해 탄소원을 제외한 PYG 합성배지에 각종 탄소원 (glucose, glycerol, lactose, maltose, sucrose, xylose, ribose, galactose, fructose, starch(1% w/v); lactate, acetate, formate (30 mM))을 첨가하였다. 질소원 영향의 경우 질소원을 제외한 PYG 합성배지에 (NH₄)₂SO₄ 1.8 g/L, peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L을 각각 또는 모두 첨가하여 균체의 성장과 수소 생산을 측정하였다. 그 외의 실험 즉 pH, 온도, 완충액 영향을 조사하기 위해 PYG 합성배지에서 seed 배양을 한 후, 균체를 모아서 A 합성배지 (L 당 3 g yeast extract, 10 g glucose, 1.0 g NH₄Cl, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g K₂HPO₄, 30 mg MgCl₂ · 6H₂O, 2.5 mg FeCl₃, 1.6 mg NiSO₄, 2.5 mg CaCl₂, 1.15 mg ZnCl₂, 1.0 mg CoCl₂ · 6H₂O, 0.5 mg CuCl₂ · 2H₂O, 1.5 mg MnCl₂ · 4H₂O)¹⁴⁾로 1회 세척한 후 균체농도를 1.4 g/L로 조절하여 serum bottle에 13 mL씩 넣고 37°C shaking incubator에서 2 시간 동안 배양한 후 pH에 따른 수소 생성을 측정하였다. 사용한 pH 완충용액(100 mM)은 다음과 같다: pH 5.0(acetate buffer와 citrate buffer), pH 6.0 및 7.0(phosphate buffer), pH 8.0 (trizma base buffer). Glucose와

yeast extract를 각각 탄소원(C)과 질소원(N)으로 사용하여 C/N 비율이 0.37~3.67 범위에서 균체 성장과 수소생산 경향을 연구하였다.

2.2 분석방법

배양 중 발생된 가스량은 배양기 내 headspace 내에 존재하는 가스량을 측정하였고, 수소 함량은 배양기 내의 headspace 가스를 gas-tight micro syringe로 100 μ l 채취하여 Molecular sieve 5A (Supelco. Inc.)를 장착한 GC (Shimadzu 14-B)로 분석하였다. 이때 칼럼, 주입구, 검출기의 온도는 각각 80°C, 100°C, 및 120°C이었고, 아르곤을 이동 가스로 35 mL/min 속도로 흘리면서 TCD (thermal conductivity detector)로 수소를 검출하였다. 유기산은 균체와 상등액을 분리한 후 상등액 20 μ l를 유기산 분석용 column인 Aminex HPX-87H를 장착한 HPLC(Shimadzu LC-10AT)로 실온에서 분석하였으며, 0.01 N H₂SO₄를 이동상(flow rate 0.6 mL/min)으로 UV detector를 이용하여 파장 210 nm에서 측정하였다. 균체농도는 일정시간 간격으로 채취한 발효액을 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu UV1)로 660 nm에서 흡광도로 측정하였으며, 건조 균체량은 전자식 수분측정기(Precisa HA300)를 이용하여 5 mL 배양액을 105°C에서 20분 간 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 미생물 복합체의 성장

하수처리장 침전조에서 발생하는 농축 하수슬러지는 복합 미생물군을 포함하는 바이오매스로 혐기성 소화분해에 관련하는 미생물을 모두 포함하고 있다. 주로 탄수화물, 지방 등의 유기물을 가수분해하는 hydrolytic bacteria, 가수분해 후 생성되는 glucose, amino acid, fatty acid 등을 발효하여 수소를 생산하는 fermentative acidogenic bacteria, 발생된 유기산, 알코올, 키톤류로부터 acetate, 이산화탄소, 수소를 발생하는 acetogenic



Fig. 1 Scanning electron micrograph of microbial consortia in the culture

bacteria와 이들로부터 메탄을 생성하는 methanogenic bacteria로 구성된다. 이와 같은 다양한 미생물군이 하수슬러지 내에 존재하지만 이들의 생리적 조건은 서로 다르다. 이 중에서도 수소를 발생하는 acidogenic bacteria는 내열성이 강한 반면, methanogenic bacteria는 열에 약한 것으로 알려져 있다. 이러한 특성을 이용하여 열처리한 결과 하수슬러지 내의 메탄생성 미생물은 사멸시키거나 불활성 시키고, 수소생산 미생물의 population이 높은 미생물 복합체를 제조하여(Fig. 1) 발효조건을 최적화하는데 사용하였다. 미생물 복합체는 본 배양에 사용한 A 합성배지에서

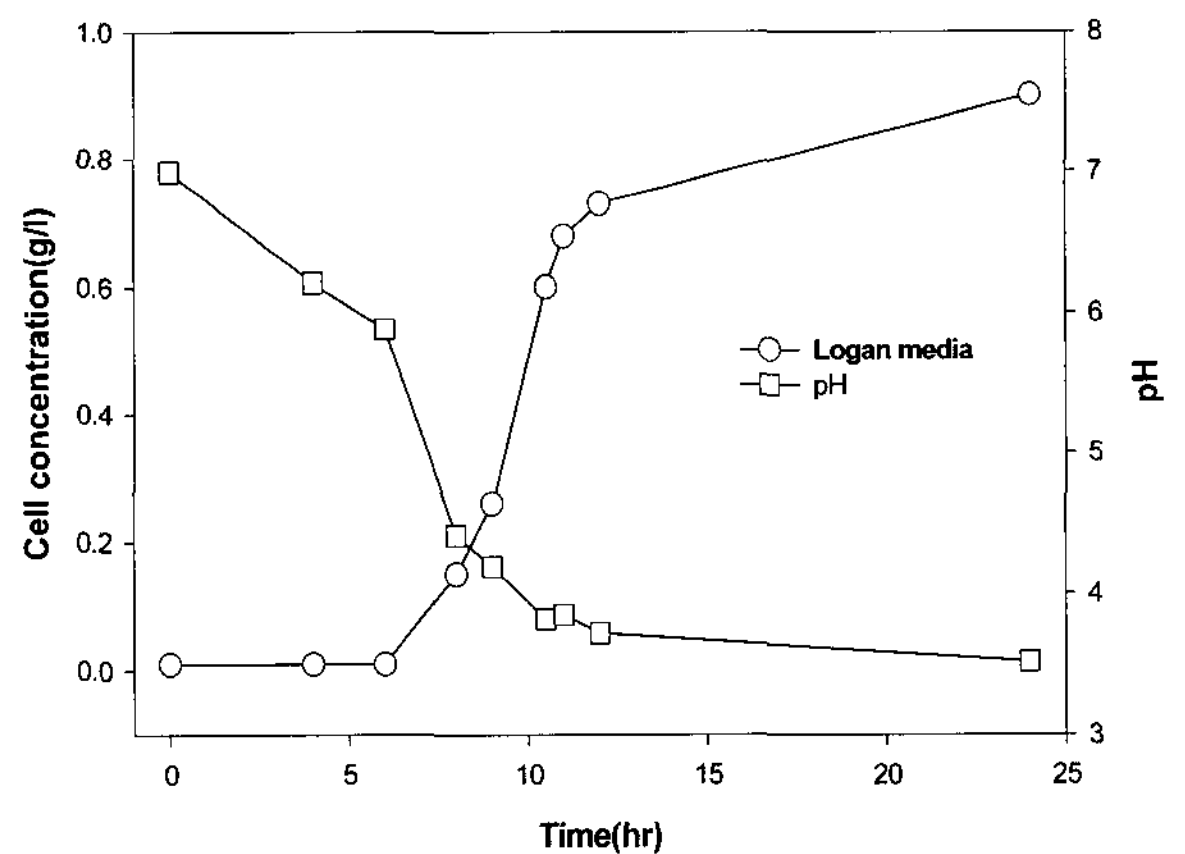


Fig. 2 Anaerobic fermentation pattern of microbial consortia isolated from heat-treated sewage sludge

약 6 시간 동안 성장 유도기를 거친 후 성장이 약 3시간에 걸쳐 증가하여 12시간 후 균체량이 약 0.75 g-dcw/L-broth로 상당히 낮았다(Fig. 2). 이와 같이 낮은 균체 성장과 균체량이 낮은 것은 두 가지로 분석할 수 있는데 첫째, 본 배양 6시간 이후 pH가 급격히 저하하여 8시간 이후에는 균체가 성장할 수 없는 pH 4 이하로 저하되었기 때문이다. 둘째, 본 배양과 seed 배양이 서로 다른 배지 조성에서 이루어졌기 때문이다. 즉 seed 배양은 유기성 단백질인 peptone, yeast extract가 첨가된 반면, 본 배양은 최소한의 단백질원이 제공되었기 때문에 균체가 새 배지에서 적응하는데 적응기간이 소요되었으며, 또한 이로 인해 긴 배양 유도기간 동안에 미생물의 활성이 낮아진 것으로 분석되었다. 배양 중 pH가 낮아지는 것은 해당작용, TCA 경로, 젖산 발효 등 혐기 대사 중에 발생하는 부산물로 주로 포도당으로부터 butyrate, acetate, propionate, lactate 등 다양한 유기산이 배양액 중에 축적되기 때문이다. 이들 유기산이 배양액의 pH를 급격히 낮추어 수소생산 복합미생물군의 균체성장이 저해된 것으로 판단된다. 이후 배양 중 급격한 pH 저하 효과를 최소화하여 균체 성장과 수소생산을 높이기 위해 인산염 완충액¹⁵⁾의 농도를 높이는 실험을 하였다 (3.4 Phosphate 완충액 농도의 영향 참조).

3.2 탄소원의 영향

Starch, sucrose, ribose, glucose, maltose 순으로 수소 생산이 높았으며, 균체는 0.6~0.9 g-dry cell wt./L-broth이었다. 이와 같은 탄소원은 비교적 쉽게 이용할 수 있는 기질인 반면, galactose, glycerol과 유기산(lactate, acetate, formate)은 본 복합균주에 의해 쉽게 이용되지 않아 낮은 균체 성장 및 수소생산이 관찰되었다. Starch와 glucose로부터 혐기 배양 중 생산되는 유기산은 lactate, succinate, formate, acetate, butyrate, propionate로 다양하였으며, 그 농도는 배양조건 특히 pH, 혐기상태, 종균에 영향을 받는 것으로 알려져

Table 1 Effect of various C-sources on cell growth and H₂ production*

| C-source | Final pH | Substrate degradation (%) | Cell growth (g-dry cell wt./L-broth) | H ₂ evolved (mL/mL-broth) |
|-----------|----------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Glucose | 4.49 | 43.9 | 0.929 | 1.273 |
| Glycerol | 6.22 | ND | 0.273 | 0.575 |
| Lactose | 4.44 | 37.4 | 0.939 | 0.923 |
| Maltose | 4.86 | 26.7 | 0.578 | 1.111 |
| Sucrose | 5.04 | ND | 0.861 | 1.655 |
| Xylose | 5.01 | 38.2 | 0.511 | 0.922 |
| Ribose | 5.14 | 27.7 | 0.562 | 1.618 |
| Galactose | 6.41 | 24.2 | 0.082 | 0.419 |
| Fructose | 4.50 | 43.1 | 0.640 | 0.993 |
| Starch | 5.19 | 78.8 | 0.634 | 2.033 |
| Lactate | 6.04 | ND | 0.227 | 0.084 |
| Acetate | 6.13 | ND | 0.315 | 0.072 |
| Formate | 6.28 | ND | 0.273 | 0.058 |

ND, not determined.

*Cells were cultivated in serum bottles for 12 h at 37°C in anaerobic condition without stirring and pH control. PYG medium without C-source was used and initial cell concentration and pH were 0.4 (absorbance at 660 nm) and 6.8, respectively

있다⁶⁾.

3.3 질소원의 영향

(NH₄)₂SO₄를 질소원으로 사용한 경우 균체는 거의 성장하지 않았으며, 첨가한 glucose도 약 30%만이 분해되었다(Table 2). Peptone이나 yeast extract를 첨가한 경우 균체량이 각각 2.9 및 4.3배 증가한 것으로 미루어 유기성 질소원이 균체 성장에 좋은 효과를 줄 뿐만 아니라 이들에 포함된 당에 의해서도 수소생산이 증가한 것으로 사료된다. 본 실험에 첨가한 (NH₄)₂SO₄ 농도는 첨가된 peptone 이나 yeast extract 보다 총 질소량이 낮기 때문에 정확한 상대적인 비교는 어렵다. 일반적으로 peptone과 yeast extract에 포함된 질소량은 각각 약 18%와 63%(제조업자 문헌정보)로 본 실험

Table 2 Effect of N-sources on cell growth and H₂ production by the mixed culture during anaerobic fermentation for 5 h at 37°C*

| N-source (conc.) | Final pH | Cell growth (g-dry cell wt./L-broth) | Glucose degradation (%) | H ₂ evolved (mL/mL-broth) |
|---|----------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (1.8 g/L) | 4.8-5.0 | 0.072 | 28.2 | 0 |
| Peptone (10 g/L) | 4.9-5.0 | 0.521 | 44.9 | 0.10 |
| Yeast extract (5 g/L) | 4.7-5.0 | 0.867 | 40.5 | 0.24 |
| 복합** | 5.0-5.2 | 1.754 | 57.0 | 0.30 |

*Cells were cultivated in serum bottles for 5 h at 37°C in anaerobic condition without stirring and pH control. PYG medium without N-source was used and initial cell concentration and pH were 0.4 (absorbance at 660 nm) and 6.8, respectively.

** (NH₄)₂SO₄ 1.8 g/L, peptone 10 g/L and yeast extract 5 g/L were added.

험 중에는 총 질소로 각각 약 1.8 g/L 및 3.2 g/L가 첨가되었다. 이와 같은 질소원의 첨가로 미루어 yeast extract가 peptone보다 균체 성장을 높인 것으로 여겨지며, 수소생산량도 상대적으로 높아진 것으로 판단된다.

3.4 Phosphate 완충액 농도의 영향

배양액의 pH는 균체성장과 수소생산에 직접적인 영향을 주는 주요 발효인자로서 예비 실험 결과 하수슬러지에서 분리한 미생물 복합체는 균체 성장과 수소생산 최적 pH는 일치하지 않지만, 균체 성장과 수소생산이 pH 5.0~7.5에서 가능한 것으로 조사되었다(data not shown).

미생물 복합체를 인산염 10, 20, 50 mM이 포함된 A 합성배지에서 배양할 때 배양 12시간 후 배양액의 pH는 각각 3.5, 3.8, 4.2로 오차범위 내에서 약간 증가하였다(Fig. 3). 이와 같은 미세한 증가는 균체 증식, glucose 분해율, 수소생산에 큰 영향을 주지 않았다. 반면, 인산염을 100 mM로 증가시켰을 때 배양 12시간 후에도 pH가 5 이상을 유

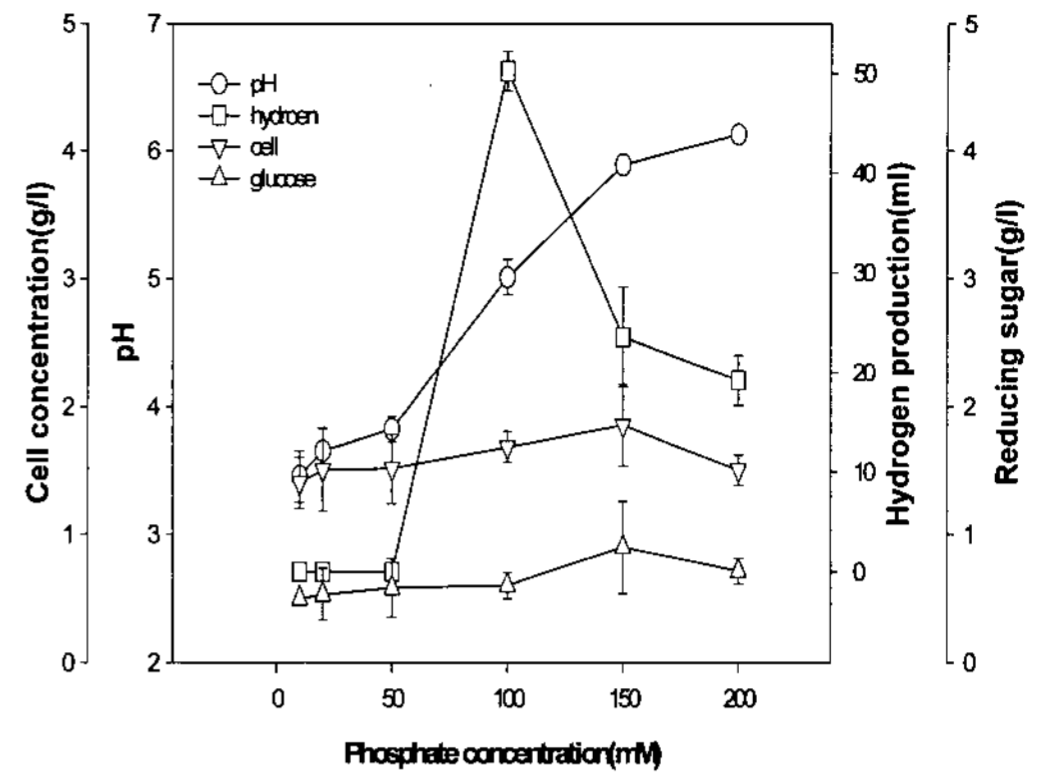


Fig. 3 Effect of phosphate concentration on various fermentation parameters during anaerobic cultivation for 12 h

지하였다. 이는 100 mM의 인산염이 발효 중 생성되는 유기산에 의한 pH 저하를 완화시킨 것으로 여겨진다. 발효액의 pH가 5 이상으로 유지됨으로써 수소생산은 증가하였고, 균체 성장도 오차범위 내에서 증가하였다. 배지 내에 인산염 농도를 100 mM 이상으로 증가시킨 경우 배양 중 pH 변화는 약 6.0~6.2를 유지하여 높은 완충력을 보였고, 균체 증식도 좋아졌지만 수소생산은 오히려 감소하였다. 이와 같은 결과는 수소생산에 적절한 pH는 5.0~5.5 근처이며 균체성장은 6.0~7.0에서 적합한 것으로 여겨진다. 그러나 인산염 농도를 200 mM로 상승시켰을 때 수소생산, 균체성장, glucose 분해력이 모두 낮아지는 것으로 미루어 높은 농도의 인산염이 저해작용을 한 것으로 여겨진다.

3.5 pH 및 온도의 영향

3.4에서 인산염 100 mM을 배지에 첨가함으로써 수소생산이 증가하였기 때문에 본 연구에서는 염농도를 100 mM로 고정한 후 각각의 다른 pH에서 수소생산과 균체 성장의 효과를 측정하였다. 최적의 완충력을 갖는 완충액(buffer)을 선택하였고 해당 완충액은 다음과 같다. pH 5.0에서는 acetate buffer 또는 citrate buffer를 사용하였고, pH 6.0와 7.0에서는 phosphate buffer를 사용하였으며, 알칼리 영역인 pH 8.0에서는 trizma base buffer를 사

용하였다. pH 5.0의 경우 발효 중 중간 산물로 생성되는 acetate의 농도가 높기 때문에 그 영향을 측정하기 위해 acetate buffer와 citrate buffer를 사용하였다. Acetate buffer를 사용한 경우 수소생성 효율이 0.05 ± 0.03 mol/mol glucose로 citrate buffer를 사용한 경우(0.16 ± 0.07 mol/mol glucose)보다 낮았다(Table 3). Citrate buffer 사용 시 lactate(13.2 mM) 및 acetate(5.1 mM)가 생성되었으나, acetate buffer 사용 시 다른 유기산은 검출되지 않았다. 이는 정량적으로 나타낼 수는 없지만 acetate buffer 사용 시 높은 농도의 acetate가 생육을 저해한 것으로 사료된다¹⁶⁾.

Phosphate buffer(pH 7)로 실험한 경우는 citrate(pH 5)보다 균체 성장과 수소생산 효율이 각각 1.29 및 3.74 배 증가하였으며, 이때 유기산으로 생성된 lactate, acetate, formate, butyrate의 농도는 각각 19.3, 6.4, 3.9, 43.21 mM이었다.

또한 미생물 복합체를 배양온도 15~45°C 범위에서 배양한 결과, 최적 온도는 37°C이었다(data not shown).

3.6 C/N 비율의 영향

Fig. 4는 C/N 비율이 수소생산과 균체 성장에 미치는 영향을 나타내었다. A 합성배지에서 탄소원(C)으로 glucose를 10 g/L로 고정하였고, 질소원

(N)으로 yeast extract량(질소함량, 약 63%; 제조업자 문헌정보)을 조절하여 C/N 비율을 0.37~3.67의 범위에서 변화시켰다. C/N 비율 0.37에서 균체성장이 2.85 ± 0.05 g/L로 가장 높았지만, 수소생산 수율은 C/N 비율 0.73~1.22에 비해 0.69 ± 0.10 mol H₂/mol glucose로 다소 낮았다. C/N 비율 0.73~1.22의 범위에서 최대 수소생산량이 관찰되었고, 이때 수소생산수율은 1.0 mol H₂/mol glucose이었다.

세포 구성물질은 수소와 산소 외에 탄소, 질소, 인, 황의 순으로 함유되어 세포 건조중량의 약 95%를 차지하고 있다. 특히 질소는 세포를 구성하는 단백질, 핵산 및 조효소의 구성성분으로써 균체 성장에 밀접한 관련이 있다. 질소원과 탄소원은 각각 고농도 균체 확보와 수소생산의 증대를 위한 주요 인자이지만, C/N의 적절한 비율이 균체와 수소생산 모두를 증대시키기 위한 중요한 인자라고 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 하수슬러지로부터 분리된 혐기세균의 혐기발효 수소생산을 연구하였고 결론은 다음과 같다.

- 1) Starch, ribose, sucrose, glucose가 미생물 복합

Table 3 Effect of pH on various fermentation parameters at 37°C

| | Citrate pH 5.0 | Acetate pH 5.0 | Phosphate pH 6.0 | Phosphatep H 7.0 | Trizma pH 8.0 |
|--|----------------|----------------|------------------|------------------|---------------|
| Final pH | 4.88±0.15 | 4.99±0.00 | 5.15±0.35 | 5.85±0.06 | 7.19±0.02 |
| H ₂ yield (mo/mol glucose) | 0.27±0.06 | 0.05±0.03 | 0.75±0.05 | 1.01±0.10 | 0.23±0.03 |
| H ₂ production rate (mol/g cell/hr) | 0.05±0.09 | 0.01±0.01 | 0.09±0.05 | 0.18±0.07 | 0.07±0.06 |
| Cell conc.(g/L) | 1.63±0.08 | 1.51±0.03 | 1.66±0.06 | 2.10±0.30 | 1.38±0.03 |
| Reducing sugar(g/L) | 4.44±0.26 | 3.08±0.03 | 2.34±0.01 | 2.19±0.04 | 3.05±0.03 |

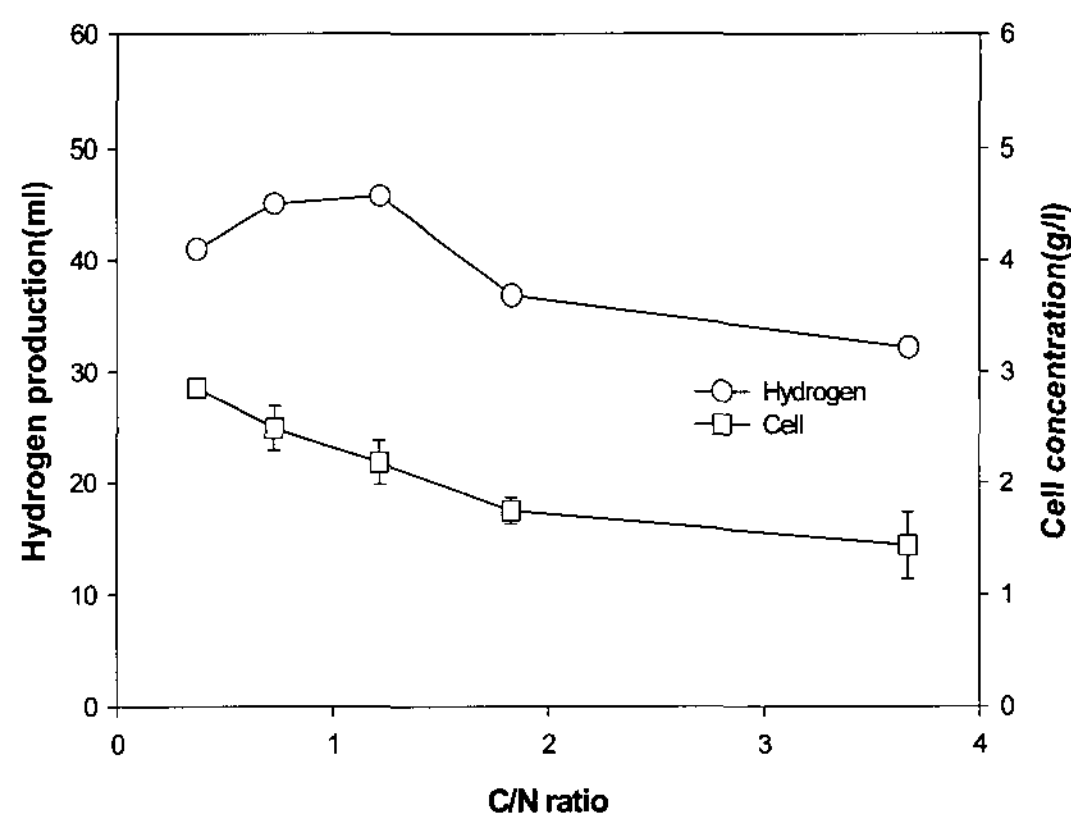


Fig. 4 Effect of C/N ratio on H₂ production and cell growth at 12 h cultivation

체의 균체성장 및 수소 생산을 위한 좋은 탄소 원이었다.

- 2) 질소원으로 yeast extract가 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 peptone 보다 높은 균체농도 및 수소생산량을 나타내었다.
- 3) 인산염 농도 100 mM은 발효 중 유기산 발생에 따른 급격한 pH 감소를 방지하였고, 이 때 최대 수소생산이 관찰되었다.
- 4) 균체성장을 위한 최적 초기 pH는 7.0이었으나, 최적 수소생산은 pH 5.5에서 관찰되었다.
- 5) 균체성장 및 수소생산을 위한 최적 온도는 37°C 이었다.
- 6) C/N 비율 0.73~1.22의 범위에서 최대 수소생산량이 관찰되었고, 이때 수소생산수율은 1.0 mol H_2 /mol glucose이었다.

후 기

이 연구(논문)는 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어 연구개발사업(수소에너지 사업단)의 일환으로 수행되었습니다. 기술적인 도움에 대해 윤영수씨에게 감사드립니다.

Reference

- 1) H. Koku, I. Erolu, U. Gündüz, M. Yücel, and L. Türker, "Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*", Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 27, 2002, pp. 1315-1329.
- 2) D. Das and T. N. Veziroglu, "Hydrogen production by biological processes", Int J. Hydrogen Energy, Vol. 26, 2001, pp. 13-28.
- 3) L. J. Stal and R. Moezelaar, "Fermentation in cyanobacteria", FEMS Microbiol. Rev., Vol. 21, 1997, pp. 179-211.
- 4) J.-H. Shin and T. H. Park, "Biological hydrogen production process", Korean Chem. Eng. Res., Vol. 44, 2006, pp. 16-22.
- 5) M. Heyndrickx, P. De Vos, and J. De Ley, "Fermentation characteristics of *Clostridium pasteurianum* LMG 3285 grown on glucose and mannitol", J. Appl. Bacteriol. Vol. 70, 1991, pp. 52-58.
- 6) H. P. P Herber and H. Liu, "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture", Bioresource Technol., Vol. 82, 2002, pp. 87-93.
- 7) C. Collet, N. Adler, J. P. Schwitzguebel, and P. Peringer, "Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous germentation of lactose", Int. J. Hydrogen Energy, Vol 29, 2004, pp. 1479-1485.
- 8) I. -S. Chang, P. Le Clech, B. Jefferson, and S. Judd, "Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment", J. Envir. Engrg, Vol. 128, 2002, pp. 1018-1029.
- 9) C. Y. Lin and R. C. Chang, "Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose", J. Chem. Technol. Biotechnol., Vol. 74, 1999, pp. 498-500.
- 10) B. K. Ahring, K. Jensen, P. Nielsen, A. B. Bjerre, and A. S. Schmid, "Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria", Bioresource Technol, Vol. 58, 1996, pp. 107-113.
- 11) C. Y. Lin and C. H. Lay, "Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora", Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 29, 2004, pp. 41-45.
- 12) O. Mizno, R. Dinsdale, F. R. Hawkes, D. L. Hawkes, and T. Noike, "Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging", Bioresource Technol., Vol. 73, 2000, pp. 59-65.
- 13) F. R. Hawkes, R. Dinsdale, D. L. Hawkes, and I. Hussy, "Sustainable fermentative

- hydrogen production, challenges for process optimisation", *Int. J. Hydrogen energy*, Vol. 27, 2002, pp. 1339-1347.
- 14) S.-E. Oh, P. Iyer, M. A. Bruns, and B. E. Logan, "Biological hydrogen production using a membrane bioreactor", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 87, 2004, pp. 119-127.
- 15) K. S. Lee, C. M. Kang, and S. Y. Chung, "Medium composition of *Enterobacter cloacae* YJ-1 for maximizing hydrogen production", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 20, 2005, pp. 350-354.
- 16) E. W. J. van Niel, P. A. M. Claassen, and A. J. M. Stams, "Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 81, pp. 255-262.