

다양한 접종원을 이용한 바이오수소 생산 평가

김근희¹, 이지호¹, 양효주¹, 이윤영¹, 양윤용², 최성호², 허문석², 이병희², 조경숙^{1*}

¹이화여자대학교 환경공학과

²국립생물자원관 유용자원분석과

Received: October 20, 2022 / Revised: October 20, 2022 / Accepted: November 30, 2022

Evaluation of Biohydrogen Production Using Various Inoculum Sources

Geumhee Kim¹, Jiho Lee¹, Hyoju Yang¹, Yun-Yeong Lee¹, Yoonyong Yang², Sungho Choi², Moonsuk Hur², Byounghee Lee², and Kyung-Suk Cho^{1*}

¹Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03760, Republic of Korea

²Biological and Genetic Resources Assessment Division, National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Republic of Korea

In this study we evaluated biohydrogen production potential as operational parameters (substrate, salt concentration, and temperature) using eight inoculum sources. While the volumetric biohydrogen production rate was significantly affected by temperature and inoculum sources, substrate and salt concentration did not have a significant effect on the biohydrogen production. Mesophilic temperature (37°C) was also found more appropriate for the hydrogen production than thermophilic temperature (50°C). Rate, while the eight inoculum sources, anaerobic digestion sludge exhibited the fastest biohydrogen production. The maximum production rate from anaerobic digestion sludge was 2,729 and 1,385 ml-H₂·l⁻¹·d⁻¹ at mesophilic and thermophilic temperature, respectively.

Keywords: Biohydrogen, inoculum source, soil, sediment, anaerobic sludge, temperature

산업화에 따른 개발과 급격한 인구 증가로 인해 전지구적인 에너지 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 화석연료는 가장 널리 사용되는 주에너지원이다[1–3]. 화석연료는 재생산되기까지 수백만 년의 시간이 소요되며, 질소산화물(NO_x), 황산화물(SO_x), 이산화탄소(CO₂) 등 다양한 대기오염물질을 배출하여 심각한 환경 문제를 초래한다[1, 2]. 이러한 화석연료의 문제점을 극복하기 위해 대체 에너지원에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 수소는 대표적인 대체 에너지원으로 각광받고 있다[2, 4, 5]. 수소는 화석연료에 비해 약 2.75배의 높은 에너지 수율(122–149 kJ/g-biomass)을 지니며, 온실가스과 같은 대기오염물질을 배출하지 않는 청정한 에너지원이다[1, 2]. 그러나 현재 국내에서 생산되는 수소의 약 96%는 화석연료에 기반하고 있으며[5], 재생이 어렵고, 많은 에너지가 필요하다는 점에서 완벽한 청정 에너지로 인정받기 어렵다[2, 6]. 반면, 유기성 폐자원으로부터 미생물의

생물학적 공정을 이용하여 생산한 바이오수소(biohydrogen)는 생산 과정에서 높은 에너지를 필요로 하지 않으며, 온실가스를 배출하지 않는 친환경적인 에너지원이다[6–8]. 또한, 수소 생산과 동시에 환경오염물질을 처리할 수 있다는 장점을 지니고 있다[1, 5]. 유기성 자원을 이용한 바이오수소 생산에는 온도, pH, 기질농도, 염농도 등 다양한 인자들이 영향을 미친다[9, 10]. 그러나 접종원의 종류, 배양 환경 등에 따라 상이한 결과가 보고되고 있다[3, 9, 10]. 본 연구에서는 회분식 실험을 통해 다양한 접종원 종류에 따른 바이오수소 생산 잠재능을 평가하였다. 나아가 기질종류, 염농도, 배양 온도 등 배양인자에 따른 바이오수소 생산능을 측정하여 바이오수소 생산을 위한 최적조건을 도출하고자 하였다.

국내에서 채취한 8종류의 시료를 접종원으로 이용하여 바이오수소를 생산하는 미생물 컨소시움을 농화배양하여 회분식 실험을 진행하였다. 8종류의 접종원은 담수 퇴적물(freshwater sediment, FS), 습지 토양(wetland, W), 산림 토양(forest soil, S), 숲 웅덩이 퇴적물(forest puddle sediment, FP), 갯벌 퇴적물(marine sediment, MS), 기수습지 퇴적물(estuary marsh sediment, ES), 염수습지 퇴적물(brine

*Corresponding author

Phone: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

Table 1. Sampling site, total solid (TS) and volatile solid (VS) of inoculum sources.

Organic source	Sampling site	Total solid (TS, wt%)	Volatile solid (VS, wt%)
Freshwater sediment (FS)	Namhan basin, Gangsang-myeon, Yangpyeong-gun	66.7 ± 0.1	3.5 ± 0.0
Wetland (W)	Buyong mountain, Yangpyeong-gun	28.5 ± 1.6	3.3 ± 0.3
Forest soil (S)	Buyong mountain, Yangpyeong-gun	20.4 ± 1.0	7.3 ± 0.3
Forest puddle sediment (FP)	Buyong mountain, Yangpyeong-gun	45.9 ± 2.2	6.0 ± 0.7
Marine sediment (MS)	Sorae marsh ecological park	23.0 ± 1.1	2.5 ± 0.1
Estuary marsh sediment (ES)	Sorae marsh ecological park	21.8 ± 0.4	2.0 ± 0.1
Brine marsh sediment (BS)	Sorae marsh ecological park	22.1 ± 0.1	1.7 ± 0.0
Anaerobic digestion sludge (AS)	Food wastes anaerobic digester	66.8 ± 5.2	16.4 ± 5.8

marsh sediment, BS) 및 혐기소화슬러지(anaerobic digestion sludge, AS)를 이용하였다. 각 접종원의 총 고형물(total solid, TS)과 휘발성 고형물(volatile solid, VS)는 각각 110°C에서 4시간 이상, 550°C에서 2시간 건조하여 측정하였다(Table 1). 회분식 실험을 위해 무기염 배지(NaHCO₃ 4 g/l, NH₄Cl 0.5 g/l, NaH₂PO₄·2H₂O 0.5 g/l, K₂HPO₄ 0.38 g/l, FeSO₄·7H₂O 25 mg/l, MgCl₂·6H₂O 8.5 mg/l, NiCl₂·6H₂O 0.4 mg/l)를 이용하였다[11]. 수소 생산능의 최적 조건을 도출하기 위해 기질종류(단일기질 및 복합기질), 염농도, 배양 온도를 배양인자로 선정하였다(Table 2). 단일기질로는 50 g/l의 글루코오스를 이용하였으며, 복합기질로는 50 g/l의 글루코오스, 0.5 g/l의 효모추출물, 10 g/l의 펩톤을 혼합하여 사용하였다(Table 2) [11]. 0 g/l과 10 g/l의 NaCl을 이용하여 염농도의 영향을 살펴보고[12], 중온(37°C)과 고온(50°C) 조건에서 진탕배양을 수행하였다(Table 2) [13, 14]. 모든 접종원은 105°C에서 2시간동안 열처리하여 준비하였다[15, 16]. 120 ml 크기의 혈청병에 전처리한 접종원 2 g과 무기염 배지 40 ml를 넣어 working volume 40 ml로 배양하였다. 혈청병은 99% N₂ 가스(Dong-A Specialty Gases Co., Ltd., Korea)로 치환 후 부틸고무마개로 밀봉하였다. 회분식 실험은 163시간, 100 rpm으로 진탕 배양하여 진행하였다. 혈청병의 수소 농도 측정을 위해 gas tight syringe를 이용하여 혈청병 상부로부터 가스를 채취하였으며, 30 m × 0.53 mm

× 25 µm의 capillary 컬럼(HP-PLOT 5A, Agilent Technologies, USA)와 열전도도 검출기(thermal conductivity detector, TCD)가 장착된 가스크로마토그래피(7890A GC system, Agilent Technologies)를 이용하여 측정하였다. 수소 가스 검출을 위해 오븐, 주입부 및 검출부 온도는 각각 90°C, 105°C 및 150°C로 설정하였다.

접종원 별로 중온(37°C)에서 배양인자(기질종류 및 염농도)에 따라 평가한 바이오수소 생산속도(ml·H₂·l⁻¹·d⁻¹)를 Fig. 1에 도시하였다. 담수 퇴적물(FS)의 최대 수소 생산속도는 1,301.7–1,990.1 ml·H₂·l⁻¹·d⁻¹이었으며, 배양인자에 따른 유의한 차이는 없었다(Fig. 1a, *p* > 0.05). 습지 토양(W)의 경우, 염을 추가한 단일기질 조건에서는 수소가 생산되지 않은 반면(*p* < 0.05), 나머지 조건에서는 최대 325.1–736.4 ml·H₂·l⁻¹·d⁻¹의 속도로 수소가 생산되었다(Fig. 1b, *p* > 0.05). 산림 토양(S)은 가장 낮은 수소 생산 활성을 보였다(Fig. 1c). 단일기질을 이용하였을 때 최대 수소 생산속도는 200 ml·H₂·l⁻¹·d⁻¹ 미만이었으며, 복합기질을 주입한 경우에는 최대 188.3–239.8 ml·H₂·l⁻¹·d⁻¹로, 단일기질에 비해 상대적으로 높은 수소 생산능을 보였다(*p* < 0.05). 숲 웅덩이 퇴적물(FP)의 경우, 배양인자에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았으며 최대 수소 생산속도는 958.9–1,500.1 ml·H₂·l⁻¹·d⁻¹였다(Fig. 1d, *p* > 0.05). 단일기질 또는 염을 추가하지 않은 복합기질 조건에서 갯벌 퇴적물(MS)의 최대 수소 생산속도는 908.4–

Table 2. Experimental conditions for batch tests to evaluate biohydrogen production from inoculum sources.

Operational parameter	Compound	Final concentration or condition	Reference
Substrate	Sole substrate (Glucose)	50 g/l	[11]
	Co-substrate (Glucose + yeast extract + peptone)	50 g/l of glucose + 0.5 g/l of yeast extract + 10 g/l of peptone	
Salt	NaCl	0 g/l	[12]
		10 g/l	
Incubation temperature	-	37°C	[13, 14]
	-	50°C	

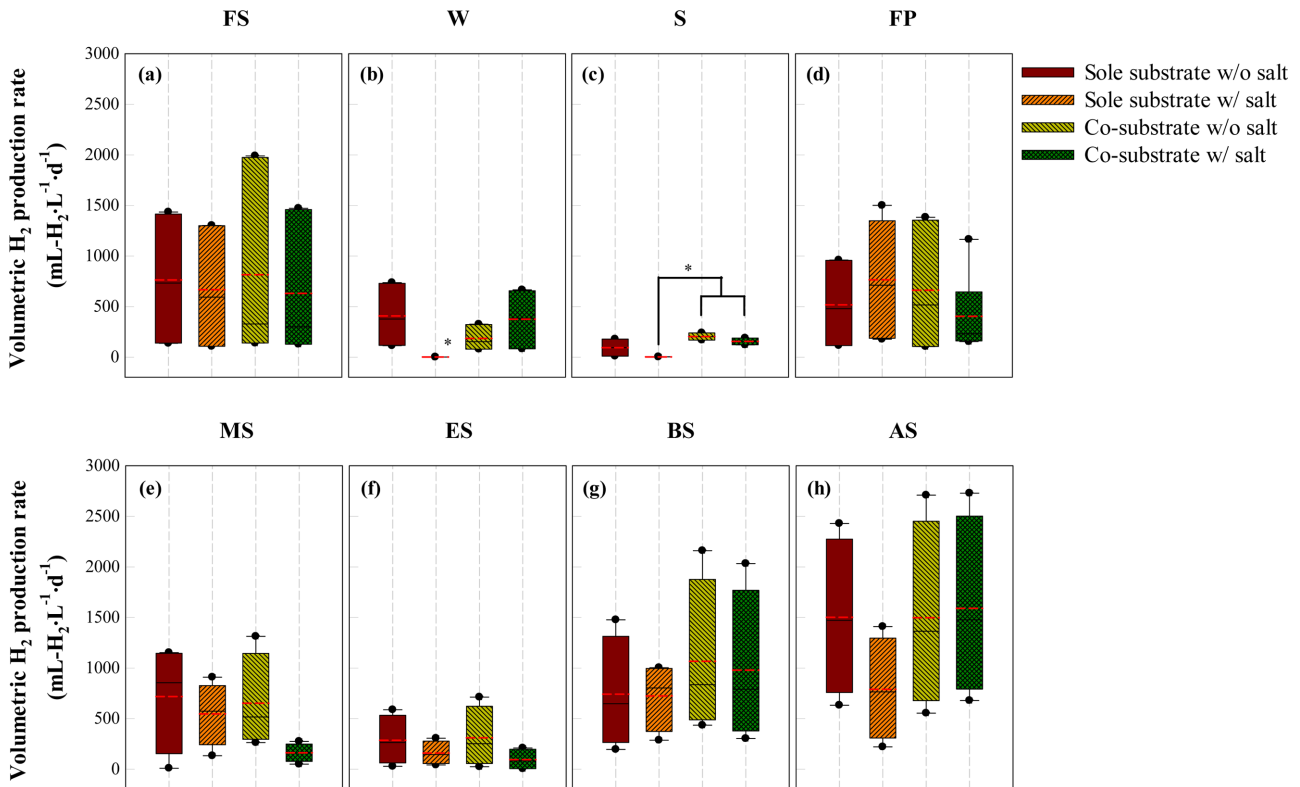


Fig. 1. Volumetric hydrogen production rate at 37 °C of incubation temperature. The boxes represent the 25th, 50th, 75th percentiles, and the error bars indicate the 5th and 95th percentiles. The red lines represent the average value. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$). (a) FS, freshwater sediment; (b) W, wetland; (c) S, forest soil; (d) FP, forest puddle sediment; (e) MS, marine sediment; (f) ES, estuary marsh sediment; (g) BS, brine marsh sediment; (h) AS, anaerobic digestion sludge.

1,312.3 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 였다(Fig. 1e). 반면 염을 추가한 복합기질 조건에서의 최대 수소 생산속도는 그보다 낮은 273.4 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 이었으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 1e, $p > 0.05$). 기수습지 퇴적물(ES)의 최대 수소 생산속도는 208.0–711.4 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 이었으며, 배양인자에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1f, $p > 0.05$). 염수습지 퇴적물(BS) 역시 배양인자에 따른 수소 생산속도에 유의한 차이는 관찰되지 않았으며, 최대 수소 생산속도는 1,002.7–2,160.0 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 였다(Fig. 1g, $p > 0.05$). 혐기소화슬러지(AS)의 최대 수소 생산속도는 1,409.4–2,729.0 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 였다(Fig. 1h). 염을 추가한 단일기질 조건에서 가장 낮은 수소 생산 속도를 보였으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 1h, $p > 0.05$). 전체적으로, 중온(37°C)에서는 기질종류 및 염 농도는 접종원별 바이오수소 생산에 유의한 영향을 끼치지 않았다. 배양인자보다는 접종원의 종류에 따라 수소 생산 속도에 차이가 나타났으며, 혐기소화슬러지(AS) > 염수습지 퇴적물(BS) > 담수 퇴적물(FS) > 숲 웅덩이 퇴적물(FP) > 갯벌 퇴적물(MS) » 기수습지 퇴적물(ES) > 습지 토양(W) » 산림 토양(S)의 순으로 높은 수소 생산능을 보였다. 수소 생산능

이 가장 높은 혐기소화슬러지(AS)의 주입기질 당 최대 수소 생산 수율은 0.74 $\text{mol-H}_2 \cdot \text{mol-glucose}^{-1}$ 이었다.

고온(50°C)에서 기질종류 및 염농도에 따른 접종원별 수소 생산속도를 Fig. 2에 도시하였다. 단일기질을 주입한 담수 퇴적물(FS)에서는 염농도에 관계없이 수소가 거의 생산되지 않았으며(최대 1.0–13.2 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 복합기질을 주입한 경우 최대 43.7–69.7 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 로, 단일기질보다 유의하게 높은 수소 생산속도를 보였다(Fig. 2a, $p < 0.05$). 한편, 습지 토양(W) 산림 토양(S) 및 기수습지 퇴적물(ES)은 고온(50°C)의 조건에서 기질종류 및 염농도에 관계없이 수소를 거의 생산하지 않았다(Figs. 2b, 2c, and 2f). 숲 웅덩이 퇴적물(FP)은 염을 주입하지 않은 복합기질에서 가장 높은 최대 수소 생산속도(253.7 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)를 보인 반면($p < 0.05$), 단일기질과 염을 추가한 복합기질 조건에서는 25 $\text{mL-H}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 미만의 낮은 생산속도를 보였다(Fig. 2d). 갯벌 퇴적물(MS)과 염수습지 퇴적물(BS)은 기질종류에 따라 수소 생산속도에 유의한 차이를 보였다(Fig. 2e and 2g). 두 종의 접종원 모두 단일기질 조건에서는 염농도에 관계없이 수소 생산이 거의 관찰되지 않았으나($p < 0.05$), 복합기질 조건에서는 각각

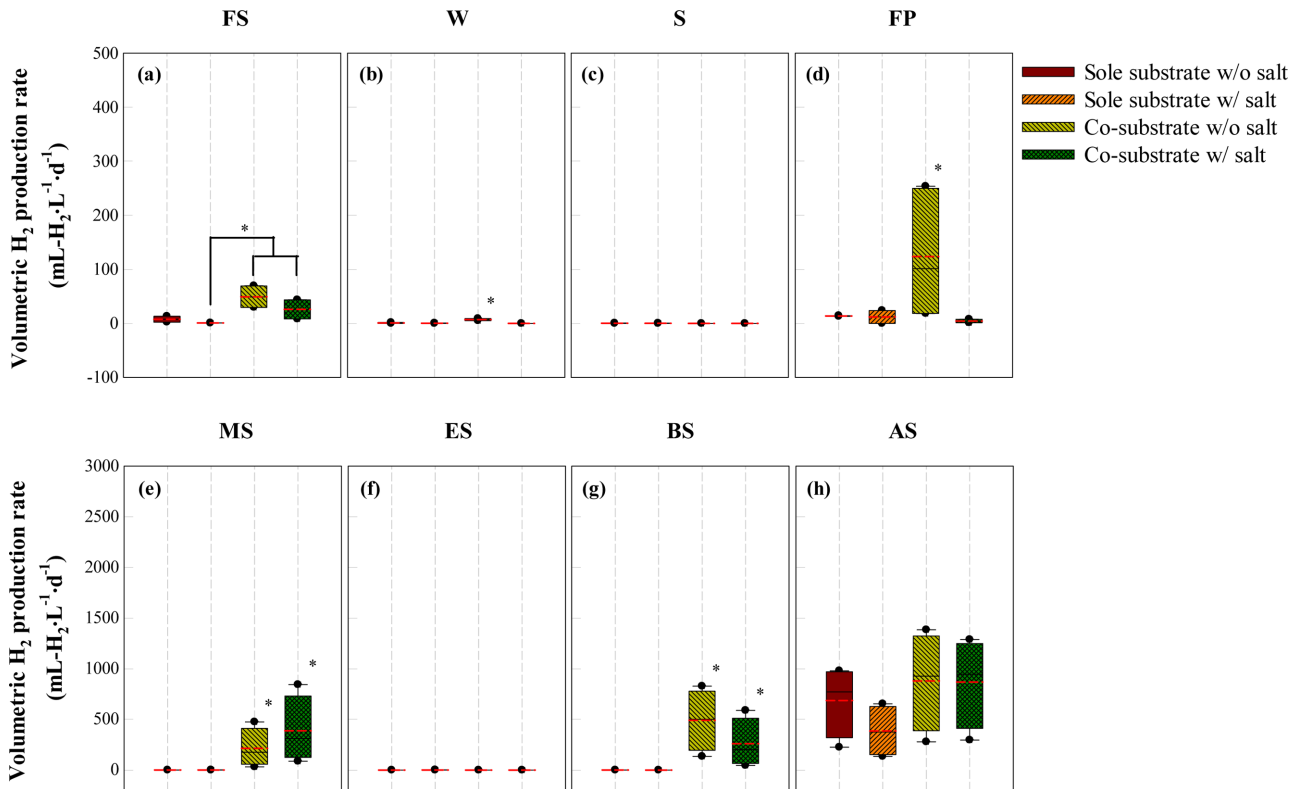


Fig. 2. Volumetric hydrogen production rate at 50 °C of incubation temperature. The boxes represent the 25th, 50th, 75th percentiles, and the error bars indicate the 5th and 95th percentiles. The red lines represent the average value. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$). (a) FS, freshwater sediment; (b) W, wetland; (c) S, forest soil; (d) FP, forest puddle sediment; (e) MS, marine sediment; (f) ES, estuary marsh sediment; (g) BS, brine marsh sediment; (h) AS, anaerobic digestion sludge.

474.7–844.1 및 588.6–828.1 mL-H₂·L⁻¹·d⁻¹의 최대 생산속도를 보였다. 혐기소화슬러지(AS)는 8종의 접종원 중 가장 우수한 수소 생산능을 보였다(Fig. 2h). 혐기소화슬러지(AS)의 최대 수소 생산속도는 653.9–1,384.7 mL-H₂·L⁻¹·d⁻¹이었으며, 배양인자에 따른 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$). 중온(37°C)에서의 결과와 비교하였을 때, 고온(50°C)에서는 모든 배양액에서 수소 생산능이 저하되었다. 또한 단일기질을 사용했을 때보다 복합기질을 사용하였을 때 대체로 수소 생산능이 향상되는 양상을 보였다. 접종원에 따라 비교해보면, 혐기소화슬러지(AS) » 염수습지 퇴적물(BS) ≈ 갯벌 퇴적물(MS) ≈ 숲 웅덩이 퇴적물(FP) > 담수 퇴적물(FS) » 습지 토양(W) ≈ 산림 토양(S) ≈ 기수습지 퇴적물(ES)의 순으로 높은 수소 생산능을 보였다. 수소 생산능이 가장 높은 혐기소화슬러지(AS)의 주입기질 당 최대 수소 생산 수율은 0.34 mol-H₂ mol-glucose⁻¹이었다.

전체적으로, 본 연구에서 이용한 접종원 종류에 따른 바이오수소 생산에는 기질종류와 염농도보다 배양온도와 접종원에 의한 영향이 크게 나타났다. 중온(37°C)이 고온(50°C)보다 수소 생산에 더 적합하였으며, 8종의 접종원 중에서는 혐

기소화슬러지(AS)가 가장 높은 수소 생산능을 보였다(Figs. 1 and 2). 온도는 바이오수소 생산에 가장 큰 영향을 미치는 대표적인 인자다[17, 18]. 접종원의 미생물 군집 구조와 배양 환경 등에 따라 최적 온도에 대한 상이한 결과가 보고되었으나, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus* 속의 대표적인 수소 생산 미생물들은 20–40°C의 중온 범위에서 최적의 활성을 보이며, 수소 생산에 가장 적절한 온도는 일반적으로 30–37°C라고 알려져 있다[10, 17, 18]. 한편, 혐기소화슬러지는 대표적인 수소 생산 접종원으로, 제한된 기질 농도, pH 및 온도 변화 등 스트레스 조건 하에서 우수한 적응 능력을 지닐 뿐만 아니라, 풍부한 미생물 군집 내 상호작용을 통한 수소 생산 잠재력을 지니고 있다[9, 10]. 본 연구 결과와 유사한 결과는 다음과 같다. Wang 등(2008)은 혐기소화슬러지를 이용하여 20–55°C에서 회분식 실험을 통해 수소 생산능을 평가하였다[19]. 20–40°C 범위에서 온도가 증가할수록 수소 생산능이 향상되었고, 수소 생산속도는 35°C에서 765.6 mL-H₂·L⁻¹·d⁻¹로 가장 높았다[19]. Shi 등(2010) 역시 혐기소화슬러지를 접종원으로 온도 및 pH 변화에 따른 수소 생산능을 평가하였으며, 동일한 pH 조건에서 수소 생산속도는

1,214.2–1,364.2 ml-H₂·l⁻¹·d⁻¹ (35°C), 389.0–667.7 ml-H₂·l⁻¹·d⁻¹ (45°C), 170.6–199.4 ml-H₂·l⁻¹·d⁻¹ (25°C)로, 중온(35°C)에서 가장 우수한 수소 생산능을 보였다[20]. 또한 Wang 등 (2011)은 혐기소화슬러지를 접종원으로 온도에 따른 수소 생산능을 평가하였고, 이를 토대로 logistic model을 이용하여 수소 생산에 적합한 최적 온도를 예측하였다[21]. 그 결과 35–40°C의 온도에서 수소 생산속도가 175.2–276.0 ml-H₂·l⁻¹·d⁻¹으로 가장 우수하였으며, 37.8°C의 온도가 최적 온도로 예측되었다[21]. 본 연구에서는 회분식 실험을 통해 8종의 접종원 별 바이오수소 생산 잠재능을 분석하였으며, 추후 유기성 폐기물을 활용한 바이오수소 생산 공정의 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

요 약

본 연구에서는 토양, 담수 및 염수 퇴적물, 슬러지 등 8종의 접종원을 이용하여 배양인자(기질종류, 염농도, 배양온도)에 따른 바이오수소 생산 잠재능을 평가하고 최적조건을 도출하고자 하였다. 각 접종원 별 바이오수소 생산속도는 배양온도와 접종원 종류에 의해 유의한 영향을 받았다. 반면 기질종류와 염농도는 바이오수소 생산속도에 대체로 유의한 영향을 끼치지 않았다. 고온(50°C)보다 중온(37°C)의 배양 온도가 수소 생산에 더 적합하였으며, 8종의 접종원 중에서 중에서는 혐기소화슬러지의 수소 생산능이 가장 우수하였다. 혐기소화슬러지의 최대 수소 생산속도는 중온(37°C)과 고온(50°C)에서 각각 2,729.0 및 1,384.7 ml-H₂·l⁻¹·d⁻¹였다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR202221103).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Saravanan A, Senthil Kumar P, Khoo SK, Show PL, Femina Carolin C, Fetcia Jackulin C, et al. 2021. Biohydrogen from organic wastes as a clean and environment friendly energy source: Production pathways, feedstock types, and future prospects. *Bioresour. Technol.* **342**: 126021.
- Cheng D, Ngo HH, Guo W, Chang SW, Nguyen DD, Deng L, et al. 2022. Advanced strategies for enhancing dark fermentative biohydrogen production from biowaste towards sustainable environment. *Bioresour. Technol.* **351**: 127045.
- Preethi, Usman TMM, Banu JR, Gunasekaran M, Kumar G. 2019. Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. *Bioresour. Technol. Rep.* **7**: 100287.
- Banu JR, Usman TMM, Kavitha S, Kannah RY, Yogalakshmi KN, Sivashanmugam P, et al. 2021. Critical review on limitation and enhancement strategies associated with biohydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* **46**: 16565-16590.
- Kim H, Im S, Mostafa A, Prakash O, Kim DH. 2021. Analysis of biohydrogen production potential from organic wastes generated in Korea. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* **43**: 591-600.
- Dawood F, Anda M, Shafiullah GM. 2020. Hydrogen production for energy: An overview. *Int. J. Hydrog. Energy* **45**: 3847-3869.
- Liu D, Sun Y, Li Y, Lu Y. 2017. Perturbation of formate pathway and NADH pathway acting on the biohydrogen production. *Sci. Rep.* **7**: 9587.
- Srivastava N, Srivastava M, Abd-Allah EF, Hashem A, Gupta VK. 2021. Biohydrogen production using kitchen waste as the potential substrate: A sustainable approach. *Chemosphere* **271**: 129537.
- Wang H, Xu J, Sheng L, Liu X, Lu Y, Li W. 2018. A review on biohydrogen production technology. *Int. J. Energy Res.* **42**: 3442-3453.
- Wong YM, Wu TY, Juan JC. 2014. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable. Sustain. Energy Rev.* **34**: 471-482.
- Yin Y, Hu J, Wang J. 2014. Gamma irradiation as a pretreatment method for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *Int. J. Hydrog. Energy* **39**: 13543-13549.
- National Institute of Environmental Research. 2012. Study on integrated management of organic waste. Available from <https://doi.org/10.23000/TRKO201700008276>. Accessed Oct. 18, 2022.
- Cakr A, Ozmihci S, Kargi F. 2010. Comparison of bio-hydrogen production from hydrolyzed wheat starch by mesophilic and thermophilic dark fermentation. *Int. J. Hydrog. Energy* **35**: 13214-13218.
- Wongthanate J, Chinnacotpong K, Khumpong M. 2014. Impacts of pH, temperature, and pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora. *Int. J. Energy Environ. Eng.* **5**: 1-6.
- Luo Y, Zhang H, Salerno M, Logan BE, Bruns MA. 2008. Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* **33**: 6566-6576.
- Iyer P, Bruns MA, Zhang H, van Ginkel S, Logan BE. 2004. H₂-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 166-173.
- Lee KS, Lin PJ, Chang JS. 2006. Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers. *Int. J. Hydrog. Energy* **31**: 465-472.
- Mu Y, Zheng, XJ, Yu HQ, Zhu RF. 2006. Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures. *Int. J. Hydrog. Energy* **31**: 780-785.

19. Wang J, Wan W. 2008. Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *Int. J. Hydrog. Energy* **33**: 5392-5397.
20. Shi XY, Jin DW, Sun QY, Li WW. 2010. Optimization of conditions for hydrogen production from brewery wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. *Renew. Energy* **35**: 1493-1498.
21. Wang J, Wan W. 2011. Combined effects of temperature and pH on biohydrogen production by anaerobic digested sludge. *Biomass Bioenerg.* **35**: 3896-3901.