

## 혐기성 생물수소 발효에서 이산화탄소 및 수소의 분압과 부산물의 거동

박우신 · † 김인수

광주과학기술원 환경공학과 BEEL 연구실

(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

### Partial Pressures of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> and Fate of By-products in Anaerobic Bio-Hydrogen Fermentation

Wooshin Park and In S. Kim†

Bio-Environmental Engineering Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering,  
Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712, Korea

(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

In a previous research, it has been found that it could be possible to increase the partial pressure of hydrogen and hydrogen yield by scavenging the CO<sub>2</sub> from the headspace of reactor. In this research, the positive and negative effects of the CO<sub>2</sub> scavenging especially on the fate of by-products were investigated by a batch experiment. Production and conversion of by-products had critical relationships with hydrogen evolution and consumption. The maximum hydrogen fraction in the headspace was increased from 66.4 to 91.2% by removing the CO<sub>2</sub> in the headspace and the degradation rate of glucose was also enhanced. The removal of CO<sub>2</sub> effectively hindered the homoacetogenesis but caused several negative phenomena. The degradation of ethanol, one of the main products, was inhibited by the high partial pressure of hydrogen and/or the absence of CO<sub>2</sub>. Also it was observed that other by-products such as propionate, propanol, acetone, etc. could not be degraded further after produced from glucose. On the other hand, solventogenesis was not observed in spite of the high hydrogen partial pressure apart from previous researches and it might hinder the excess production of acetate, which could cause overall inhibition. From this research, it could be implicated that the CO<sub>2</sub> scavenging method could be recommended if the fermentation was purposed to produce hydrogen and ethanol.

**Key Words** : Hydrogen partial pressure, CO<sub>2</sub>, fermentation, by-products

#### 서론

산업화의 가속과 더불어 화석연료의 사용은 급증하고 있고 그에 반해 화석연료의 매장량은 한정되어 있기 때문에, 21세기에 접어들어 대체에너지 개발에 세계적으로 많은 관심이 집중되고 있다. 더욱이 최근의 유가 폭등은 이러한 연구의 필요성을 한층 더 부각시키고 있다고 할 수 있다. 대체 에너지로 이용될 수 있는 것들로는 풍력, 조력, 태양력, 소수력 등의 발전 수단과 메탄올, 에탄올, 메탄, 그리고 수소 등과 같은 연료 물질들이 있다. 이중 메탄올, 에탄올, 메탄 그리고 수소와 같은

연료는 일순간에 대량의 에너지를 요구하는 수송 수단을 위해 반드시 필요한 부분이라고 할 수 있다.

혐기성 발효공정은 이러한 연료물질들을 생산할 수 있는 기술들 중 하나이다. 그러나 혐기성 발효는 주로 유기성 오염물을 처리하여 메탄을 발생시키기 위한 방향으로 연구되어 왔다 (1). 하지만 일부 연구의 방향은 혐기성 생물수소의 발생을 통해 대체에너지 개발을 위한 연구의 일부분으로 활발이 진행되고 있다. 수소 (118.2 kJ/g)는 메탄 (36.3 kJ/g)에 비해서 단위 질량당 보유에너지가 약 3배 가량 높고, 연소 후에 발생하는 물질은 화석연료나 에탄올, 메탄올, 메탄 등과는 달리 이산화탄소를 제외한 물이기 때문에 환경친화적인 에너지원이다(2). 또한 혐기성 수소발효는 수소 생산을 위한 원료로 유기성 폐자원을 활용할 수 있기 때문에 환경과 에너지로써의 가치를 동시에 확보할 수 있는 기술이라 할 수 있다(3, 4).

그러나 현재까지 혐기성 발효 공정을 통해 발생되는 수소는 그 효율이 탄수화물을 기준으로 2 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose 정도로 아주 낮다. 이론적으로 글루코즈 1 몰로부터 약 12 몰의 수소

† Corresponding Author : Bio-Environmental Engineering Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712, Korea

Tel : +82-62-970-2436, Fax : +82-62-970-2434

E-mail : iskim@gist.ac.kr

가 발생하는데 이론적인 수치에 비해 실제 발생량은 극히 저조하다. 하지만 아직까지 이러한 낮은 수소 발생량과 수소의 발생에 관여하는 인자들에 대한 뚜렷한 연구보고가 없는 실정이다. 일차적으로는 사용하는 균주를 중요한 인자로 가정할 수 있다. 지금까지의 연구 결과들을 살펴볼 때, *Clostridia*가 가장 효율적으로 수소를 발생 시키는 것으로 알려져 있다. Collet *et al.*(2004)은 *Clostridium thermolacticum*을 이용해 2.1-3.0 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose의 결과를 얻은 것으로 보고하였고, Yokoi *et al.*(1998)은 *C. butyricum*과 *Enterobacter aerogenes*의 혼합 균주를 이용하여 약 2.6 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose의 수소를 발생 시킨 것으로 보고하였다(5, 6). 수소의 발생량은 반응기의 운전 모드에 영향을 받는 것으로 보고 된 바도 있는데, 열처리한 혐기성 슬러지를 이용한 수소 발생 실험에서 회분식 실험의 경우에는 0.99 그에 반해 연속식으로 운전하였을 경우에는 0.91-1.8 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose로 다소 높게 나타난 경우가 그 예라고 할 수 있다(7, 8). 연속식에 비해 회분식의 운전 모드에서 낮은 수소 발생률이 나타나는 이유에 대한 명확한 설명은 아직 불가능하지만, 이러한 혼합 균주의 경우는 미생물 종의 구성이 중요하다는 것은 명확하다(8).

수소의 발생은 미생물들이 만들어내는 다양한 hydrogenase와 dehydrogenase에 의해 결정되는데 이러한 효소들이 정반응에 기여하는지 역반응에 기여하는지에 따라 수소의 발생과 소모가 영향을 받는다고 할 수 있다. 수소 발생 및 소모 효과가 관여하는 이러한 반응들은 반응기 내의 수소의 분압과 밀접한 관계가 있다. 또한 수소의 발생에 기여하는 hydrogenase 중에는 수소에 의해 저해를 받는 경우도 많다. 예를 들어, *Ruminococcus flavifaciens*의 경우 ferredoxin의 oxidation을 통해 수소를 생성하는 hydrogenase를 생성하는데 이 효소의 경우 수소에 의해 저해를 받는다(9). *C. acetobutylicum*은 대표적인 수소 생성 미생물로 알려져 있는데, 이 균주의 경우 글루코스를 분해하여 acetate와 butyrate를 생성하고 그 과정 중에 수소를 발생시키는데, 수소의 분압이 증가할 경우 acidogenesis에서 butanol, ethanol, acetone이 생성되는 solventogenesis로의 pathway 전환이 발생한다(10, 11). Solventogenesis로 pathway의 전환이 일어나면 NAD(P)H의 산화가 일어나며 이에 필요한 전자는 수소로부터 공급된다. 결론적으로 수소 분압의 증가는 hydrogenase의 활성을 저해하는 결과를 초래하며 수소의 발생에 치명적이다. 혼합 균주를 이용할 경우, 수소 분압의 증가는 갑작스런 수소 발생률의 저하를 초래할 수도 있다. Logan *et al.*(2004)은 이러한 문제의 해결을 위해 회분식 반응기에서 계속적으로 headspace의 gas를 제거해 줌으로써 수소 발생률을 43% 정도 증가시켰고, 또한 headspace에 진공을 걸어주거나 N<sub>2</sub> gas 등의 sparging을 통해 용존 수소를 제거함으로써 수소 발생률을 향상시킬 수 있다고 보고하였다(7).

수소의 발생률 향상을 위한 또 다른 시도로 이산화탄소의 제어를 들 수 있다(2, 12). 용존 이산화탄소와 headspace의 이산화탄소를 제어함으로써 이산화탄소와 관련된 수소 소모 반응, 대표적으로 autotrophic acetogenesis를 억제해 도모하는 것이다.

이전의 연구를 통해 headspace로부터 이산화탄소를 제거할 경우 수소의 분압이 급격히 증가하고 수소의 발생률이 증가함을 관찰하였다(2). 본 연구에서는 회분식 실험을 통해, 이러한

이산화탄소의 제어가 수소발생에 있어서 이로운 점 외에 미칠 수 있는 영향을 확인하고자 하였다. 혐기성 발효에서 글루코스로부터 수소 이외에 butyrate, ethanol 등의 부산물이 발생되며 이러한 부산물은 acetate로 전환되면서 수소 발생에 기여할 수도 있고 solvent로 전환되어 NAD(P)H의 요구량을 증가시켜 수소 소모를 초래할 수도 있다. 또한 특정 부산물의 축적을 통해 전체적인 반응에 저해현상을 나타낼 가능성도 있다.

## 재료 및 방법

### 미생물 식종 및 배지

실험을 위한 미생물은 G시의 하수처리장에서 발생하는 탈수슬러지를 스테인리스 판 (20 cm x 40 cm)에 약 5 mm 두께로 편 후, 104°C에서 1 시간 동안 열처리를 하여 이용하였다. 열처리된 슬러지는 밀폐용기에 담아 headspace를 질소가스로 치환하여 4°C에 보관하였다. 수소 발생 반응의 유도를 위한 배지는 N/M (nutrient/mineral) 용액(13)에 글루코즈(2 g/L = 11.1 mM)를 유기물원으로 함유하여 조제하였고, 미생물 농도는 건조 슬러지를 이용하여 1 g/L로 조절하였다. 유기물 농도는 과도한 이산화탄소의 발생을 방지하여 효율적인 이산화탄소의 제거를 위해 낮게 설정하였다. 배지의 pH는 0.07 M 2-(N-mopholono) ethanesulfonic acid monohydrate (MES) (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, New Jersey, USA.)를 이용하여 6.2로 조절하였다.

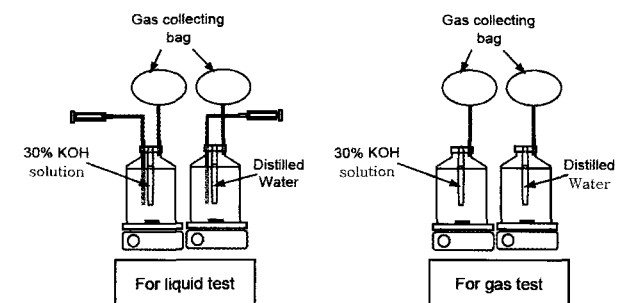


Figure 1. Experimental setup for analyzing gas composition and by-products (Liquid samples were taken with a 5-mL syringe and all reactors were duplicated).

### 실험장치 및 방법

실험은 가스 측정과 글루코즈의 분해산물을 측정하기 위해 같은 조건에서 2 set의 반응기들을 이용하였다. 총 8개의 300-mL medium bottle에 각각 250 mL의 용액배지를 넣고 0.4 g의 슬러지를 첨가하여 미생물 농도를 1 g/L로 조절하였다. 각 반응기는 질소가스로 10분간 flushing하여 밀폐한 후, 실험 기간 동안 30±1°C의 항온실에서 300 rpm으로 교반하였다. 이 중 4개의 반응기는 KOH 용액 (30 wt%) 5 mL가 들어있는 이산화탄소 제거 trap을 Fig. 1처럼 병목부위에 장착하였고 나머지 4개는 KOH 용액 대신에 증류수 5 mL을 채운 trap이 장착되었다. 반응기는 이산화탄소가 제거되는 것과 제거되지 않고 최종반응까지 관여하는 것으로 나뉘어지며, 중복실험을 위해 증류수가 채워진 trap이 설치된 bottle 2개와 KOH 용액이 채워진 trap이 장착된 bottle 2개가 한 set을 구성하였다. 이와 같이, 4개

의 bottle로 이루어지는 1 set은 1 L-polypropylene 가스 포집팩에 연결하여 headspace의 가스 성분 분석에 이용되었고, 나머지 4개의 bottle도 같은 가스 포집팩에 연결하여 글루코스의 분해 부산물의 변화를 분석하기 위해 이용되었다. 본 실험에서는 용액샘플의 채취에 의한 headspace의 변화는 전체적인 반응에 영향을 미치지 않는 것으로 가정하여, 위 2 set의 반응기들은 같은 조건에서 반응이 이루어지는 것으로 간주하였고, 이산화탄소가 제거되지 않은 반응기에서 수소가 고갈되는 시점을 반응의 종료시점으로 하였다.

### 분석방법

Headspace의 가스성상은 gas-tight syringe (0.25 mL injection volume)를 이용하여 주기적으로 샘플을 채취하여 thermal conductivity detector (TCD)와 CROPACK column이 장착된 gas chromatography (GC; Hewlett Packard 5890 series II)로 분석하였다. Carrier gas로 질소가스를 이용하였고, oven, detector 그리고 injector의 온도는 각각 75, 200, 200°C였다.

By-product의 분석을 위해 주기적으로 1 mL의 샘플을 채취하여 1.7-mL centrifuge tube (MCT-175-C, Axygen Scientific, Inc., Union City, CA, USA.)에 주입한 후, HgCl<sub>2</sub> 용액 (16 g HgCl<sub>2</sub>/L)을 20 L 첨가하여 미생물의 활성을 제거하고, 6610 x g에서 15분간 고액분리하여 상등액을 채취하여 분석에 이용하였다. By-product로는 대표적으로 acetone, ethanol, n-butanol, n-propanol, acetate, propionate, butyrate, valerate를 flame ionization detector (FID)와 carboxypack column (B-DA on 80/120 mesh 4% carbowax 20 M)이 장착된 gas chromatography (GC; Hewlett Packard 5890 series II)를 이용하여 분석하였다. 운전조건으로는 oven, detector, injector의 온도가 각각 175, 200, 200°C였으며, carrier gas로는 질소를 이용하였고 유속은 24 mL/min이었다. 글루코스는 phenol/sulfuric acid method를 이용하여 분석하였고(14), 초기와 최종 pH는 portable pH meter (ISE/pH/V/ORP/Temp. meter, Orion, model 290A)를 이용하여 측정하였다.

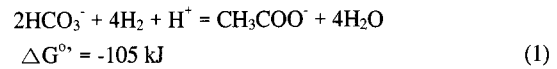
## 결과 및 고찰

### Headspace의 수소 및 이산화탄소의 분압과 발효부산물의 관계

Glucose는 이산화탄소가 수반된 경우 14시간, 이산화탄소가 제거된 경우는 11시간을 전후로 고갈되었다(Table 1). 따라서 이 시간 이후의 반응은 glucose가 배제된 headspace의 기체와 용액 중의 부산물들 간의 반응으로 고려할 수 있다. 최대 수소 함량은 평균 66.4%와 91.2%로 이산화탄소가 제거 될 경우 월등히 높아지는 것으로 나타났고, pH의 경우도 후자의 경우가 6.15로 거의 저하되지 않은 것으로 나타났다.

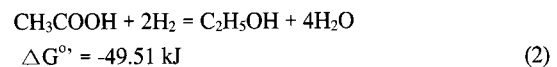
열처리한 슬러지를 이용한 glucose의 발효에서 대표적인 부산물은 H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ethanol, acetate였다(Fig. 2). 선행된 연구에서의 결과(2)와 유사하게 일반적인 반응(Fig. 2(a))에서 headspace의 수소는 증가하는 경향을 보인 후 급격히 소모된 반면, 이산화탄소가 제거된 반응기에서는 실험이 종료되는 시점까지 85% 이상의 가스가 수소로 유지되었다(Fig. 2(b)). 이는 이산화탄소의 존재가 수소의 소모와 밀접한 관계가 있음을 시사하는 결

과이다. Oh *et al.*(2003)은 열처리 한 슬러지를 이용한 수소발생 실험에서 homoacetogenesis(식 1)에 의한 수소의 소모에 대해, *Clostridium acetivum*이나 *C. thermoautotrophicum*과 같은 좋은 포자를 형성하여 열처리에서 생존하며 이산화탄소와 수소를 이용하여 직접적으로 acetate를 생성함을 지적하였다(15).



수소의 소모가 homoacetogenesis에 기인하였음을 보여주는 실험적 증거는 이산화탄소가 제거되었을 경우에 나타나는 현상이다(Fig. 2(b)). 이산화탄소의 부재로 인해 수소 소모반응이 억제되었고 그 결과로 나타난 것은 acetate의 농도 증가가 발생하지 않았다는 것이다. 반면, Fig. 2(a)의 경우는 acetate의 증가와 이산화탄소 및 수소의 감소가 뚜렷하게 관찰되었다.

Oh *et al.*(2003)은 수소소모 반응에 대해 또 하나의 가능성을 언급한 바 있다(15). 즉, 수소의 분압이 높아짐에 따라 acetate와 수소로부터 에탄올이 발생할 수 있다는 것이다(식 2).



하지만 본 연구에서는 수소가 85%를 넘는 상태에서도 뚜렷한 ethanol의 증가는 관찰되지 않았다. 30시간 이후에 약 1-2 mM의 ethanol 증가가 관찰되었고 수소의 양이 점차 감소하는 경향이 보였으나, ethanol의 생성에 따른 수소의 소모를 확인할 수 있는 정도의 결과는 아닌 것으로 사료된다.

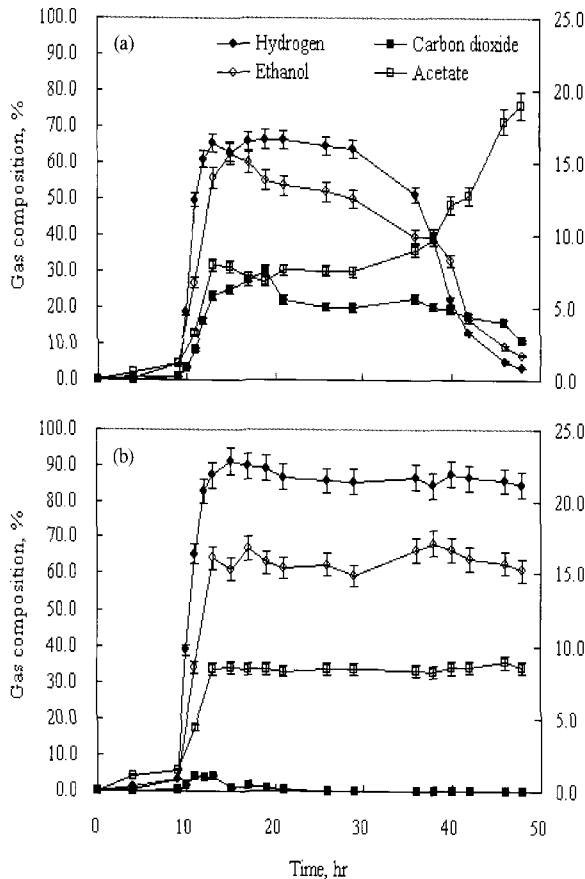
선행 연구에서 이산화탄소의 제거를 통해 약 43%의 수소 수율을 향상시켰다(1.4에서 2.0 mol-H<sub>2</sub>/mol-glucose)(2). 즉, 이산화탄소의 제어는 본 실험의 결과와 마찬가지로 homoacetogenesis를 효과적으로 억제하는 수단이 됨을 나타낸다. 또한 이산화탄소의 제거는 glucose의 분해속도를 향상시키고 pH의 저하도 어느 정도까지는 방지할 수 있게 한다. 하지만, 부산물의 거동을 기준으로 판단할 경우 부정적인 측면을 지적하지 않을 수 없다. Fig. 2(b)에 나타난 바와 같이 이산화탄소가 제거된 경우 ethanol의 농도는 glucose로부터 발생된 이후 거의 일정하게 유지되고 있다. 이러한 결과는 장기 운전시 에탄올의 축적 가능성을 시사한다. 그에 반해 이산화탄소가 존재할 경우에는 수소의 소모를 통해 수소분압이 감소하고 ethanol의 분해도 동시에 일어나는 것을 알 수 있다. 앞선 연구(2)에서 유기물의 mass balance를 이용하여 ethanol이 acetate로 전환될 때 발생하는 수소 또한 이산화탄소가 존재할 시 homoacetogenesis에 의해 최종적으로 acetate로 전환됨을 보여주었다. 또한 ethanol이 acetate로 분해될 때 발생하는 이산화탄소는 homoacetogenesis에 이용된다. 즉, 수소의 소모와 ethanol의 분해는 서로 밀접한 관계임을 알 수 있다. 본 연구에서는 수소의 양이 45% 이하로 감소하면서 ethanol의 급격한 감소가 관찰되었다. 하지만 이러한 결론을 유도함에 있어서 하나의 의문점이 남게 된다. Ethanol이 분해되지 않는 것이 이산화탄소의 부재로 인한 결과인지 아니면 이산화탄소의 제거로 인해 증가한 수소의 분압으로 인한 것인지 하는 문제이다. 수소의 분압이 hydrogenase와 dehydrogenase의 활성과 밀접한 관계를 나타내는 것으로 나타난 기존의 보고들(10, 11)로부터 유추한다면 후자

의 경우가 타당할 것이나 아직 정확한 결론을 얻기에는 부족한 것으로 사료된다.

이산화탄소의 제거는 수소의 수율을 증가시키는 장점과 ethanol이 분해되지 않는 단점을 동시에 보여주고 있다. 하지만, acetate의 과도한 발생을 억제하므로 acetate에 의한 저해현상을 다소 방지 할 수 있으며, 만약 목표 부산물이 수소와 ethanol이라면 이상적인 방향이 될 수 있을 것으로 사료된다.

**Table 1.** Results obtained from batch hydrogen production tests (indicates the data range based on duplicate samples)

Parameter	W/O CO <sub>2</sub> -scavenging	W/ CO <sub>2</sub> -scavenging
pH initial	6.20±0.01	6.20±0.01
pH- final	5.84±0.02	6.15±0.03
Time for 90% conversion of glucose, hr	14.0±0.3	11.0±0.3
Maximum H <sub>2</sub> concentration, %	66.4±0.3	91.2±0.5



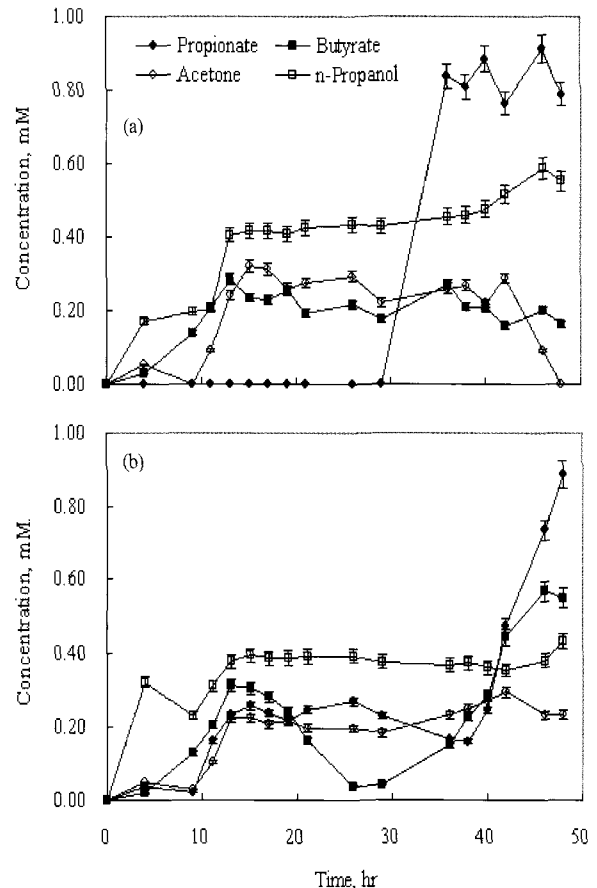
**Figure 2.** Concentrations of ethanol and acetate and gas composition ((a) Results from the reactors without CO<sub>2</sub> scavenging; (b) Results from the reactors with CO<sub>2</sub> scavenging. Error bars indicate the data ranges based on duplicate samples).

**미량 발효부산물들의 거동**

Ethanol과 acetate와는 달리 1 mM 이하로 검출된 부산물은 propionate, butyrate, acetone, n-propanol이었다. 그 외에 n-butanol, valerate는 검출되지 않았다. 수소의 분압이 올라감에 따라 solvent의 발생이 증가할 것이라는 예상과는 달리 뚜렷한 경향을 보이는 solvent는 나타나지 않았다. 기존의 보고(10, 11)에 따

르면, 이산화탄소의 제거를 통해 수소의 분압이 급격히 상승하였기 때문에 글루코즈의 분해산물 중 solvent가 차지하는 비율이 상승하여야 하나 이산화탄소가 제거되지 않은 경우와 별다른 차이를 보이지 않았다. 열처리 된 culture에서 solventogenesis를 수행할 수 있는 종은 *C. acetobutylicum*과 *C. beijerinckii*와 같은 종을 들 수 있는데(16), 이러한 가능성에도 불구하고 본 연구에서 이용된 열처리된 culture를 통한 glucose의 발효에서는 증가된 수소 분압에 의한 영향을 확인 할 수는 없었다.

이산화탄소의 제거를 기준으로 두 가지 반응에서의 차이점은 이산화탄소가 존재하는 반응의 경우, acetone은 수소의 분압이 20% 이하로 감소하는 시점에서 분해가 일어났다는 것과 이산화탄소가 제거된 반응의 경우 반응 후반부에 butyrate의 증가가 관찰되었다는 것이다. Acetone의 분해는 수소소모 반응에 연계해서 일어나는 일반적인 반응이라 할 수 있지만(17), butyrate의 증가는 특이한 부분이라 할 수 있다. 이산화탄소가 제거되지 않은 반응기의 경우, 수소 분압의 감소와 더불어 ethanol이 분해되었고(Fig. 2(a)), 그리고 acetone이 분해되며, 후반부에 butyrate 또한 분해가 시작되었다(Fig. 3(a)). 그에 반해 이산화탄소가 제거된 경우에는 반응 후반부에 오히려 butyrate가 증가하는 경향을 보였는데, 이는 이산화탄소의 부재와 높은 수소분압의 영향이라는 추측은 가능하나 본 실험에서 얻어진 결과들로는 해석이 불충분한 부분으로 사료된다.



**Figure 3.** Concentrations of other by-products produced in small amounts.

## 요 약

Headspace의 이산화탄소 제거는 수소의 수율을 올릴 수 있는 효과적인 방법이지만, 증가된 수소의 분압(최대 91.2%)과 이산화탄소의 부재에 의해 글루코스의 발효 경향에 상당한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이산화탄소의 제거는 homoacetogenesis에 의한 수소의 소모를 효과적으로 억제하였지만, 주요발효 부산물인 ethanol 및 기타 발효 부산물의 분해 또한 억제하는 결과를 나타내었다. 또한 소량으로 발생한 부산물들의 분석결과에서 이산화탄소가 제거된 반응에서 반응 후반부에 butyrate의 증가하는 현상이 관찰되었다. 하지만, 기존의 연구결과들처럼 증가된 수소의 분압에 의한 과도한 solvent의 생성은 관찰되지 않았으며, acetate의 과도한 발생을 방지할 수 있어 acetate에 의한 저해현상을 다소 억제할 수 있을 것으로 사료된다. 이산화탄소가 제거될 경우 최종 산물이 수소와 ethanol이므로 목적 반응이 hydrogen-ethanol fermentation이라면 이상적인 방향을 제시할 수 있을 것이다.

## 감 사

본 연구는 과학기술부 (한국과학재단) 특정기초연구(R01-2005-000-10574-0) 지원과 일부 광주과학기술원 분산센터 네트워크 연구소와 한국과학기술평가원의 환경모니터링연구센터의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- 장남정, 황문현, 현승훈, 김인수 (2001), 이상혐기성공정의 산생성 단계에 유입수의 알칼리도가 미치는 영향, *대한환경공학회지* **23**(12), 2097-2104.
- Park, W., S. H. Hyun, S. Oh, B. E. Logan, and In S. Kim (2005), Removal of headspace CO<sub>2</sub> increases hydrogen production, *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4416-4420.
- Tanisho, S., Y. Suzuki., and N. Wakao (1987), Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005, *Int. J. Hydrogen Energy* **12**, 623-627.
- Han, S. K. and H. S. Shin (2004), Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 569-577.
- Collet, C., N. Adler, J. P. Schwitzguebel, and P. Peringer (2004), Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1479-1485.
- Yokoi, H., T. Tokushige, J. Hirose, S. Hayashi, and Y. Takasaki (1998), H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*, *Biotechnol. Lett.* **20**, 143-147.
- Logan, B. E., S. E. Oh, In S. Kim, and S. Van Ginkel (2002), Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometer, *Environ. Sci. Technol.* **36**, 2530-2535.
- Iyer, P., M. A. Bruns, H. Zhang, S. Van Ginkel, and B. E. Logan (2004), Hydrogen gas production in a continuous flow bioreactor using heat-treated soil inocula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 119-127.
- <http://www.vet.ed.ac.uk/clive/cal/RUMENCAL/info/infMeth.html>
- Doremus, M. G., J. C. Linden, and A. R. Moreira (1984), Agitation and pressure effects on acetone-butanol fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 852-860.
- Yerushalmi, L., B. Volesky, and T. Szczesny (1985), Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 103-107.
- Tanisho, S., M. Kuromoto, and N. Kadokura (1998), Effect of CO<sub>2</sub> removal on hydrogen production by fermentation, *Int. J. Hydrogen Energy* **23**, 559-563.
- Kim, I. S., M. H. Hwang, N. J. Jang, S. H. Hyun, and S. T. Lee (2004), Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1133-1140.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analyt. Chem.* **28**, 350-356.
- Oh, S. E., S. Van Ginkel, S., and B. E. Logan (2003), The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production, *Environ. Sci. Technol.* **37**, 5186-5190.
- Qureshi, N. and H. P. Blaschek (2001), Evaluation of recent butanol fermentation, upstream and downstream precessing, *Bioproc. Biosys. Eng.* **24**, 219-226.
- Schmidt, J. E. and B. K. Ahring (1995), Interspecies electron transfer during propionate and butyrate degradation in mesophilic, granular sludge, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2765-2767.