한국생물공학회지 제20권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 20, No. 6, 425-430(2005)

CSTR의 장기운전을 통한 포도당으로부터의 고온 수소생산

[1]안 영 희 · [2,3]오 유 관 · † [2,3]박 성 훈
[1]한국과학기술원 생명화학공학과, [2]부산대학교 화학생명공학과, [3]부산대학교 환경기술산업개발연구센터
(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

Thermophilic Biohydrogen Production from Glucose with a Long-term Operation of CSTR

Yeonghee Ahn[1], You-Kwan Oh[2,3], and Sunghoon Park[2,3]†
[1]Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea
[2]Department of Chemical and Biochemical Engineering, Pusan National University, San 30 Jangjeon-dong, Kumjung-gu, Busan 609-735, Korea
[3]Institute for Environmental Technology and Industry, Pusan National University, San 30 Jangjeon-dong, Kumjung-gu, Busan 609-735, Korea
(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

Thermophilic H_2 was produced for 1 year using a bench-scale continuous stirred tank reactor (CSTR). The CSTR was inoculated with anaerobically digested sludge after heat treatment and fed with a glucose-based medium. The reactor showed relatively short start-up period (30 days) and high maximal H_2 yield (2.4 mol H_2/mol glucose). Keeping pH 5.0 or less suppressed methanogenic activity. Bacteria affiliated with *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* kept being dominant from approximately 40 days as determined by DGGE. Environmental perturbation (pH or temperature) caused the decrease of biomass concentration in the reactor and the instability of reactor performance, H_2 production rate and H_2 yield. The unstable performance was accompanied with high concentration of lactate in the effluent. Taken together, the poor recovery of CSTR after perturbations could be partly explained by low biomass concentration and/or metabolic shift of the major population in the CSTR.

Key Words : Anaerobic, biohydrogen production, CSTR, microbial community, thermophilic

서 론

미생물에 의한 H_2 생산은 광합성 또는 발효에 의한다. 발효에 의한 H_2 생산은 통성 또는 절대 혐기성 미생물의 활성에 의해 이루어지며, 빛과는 상관없이 H_2를 생산할 수 있다는 장점과 더불어 광합성에 의한 H_2 생산에 비해 일반적으로 반응이 빠른 것으로 알려졌다(1, 2). 혐기성 발효에 의한 연속 H_2 생산 공정에 대한 연구는 continuous stirred tank reactor (CSTR)과 같은 현탁된 배양액을 주로 사용해왔다(1-3). CSTR과 같은 system은 비교적 장비가 간편하며 운전도 용이하다는 장점이 있다. 그러나 washout에 의한 biomass의 소실이 쉽게 일어나므로 반응기 내에 biomass 농도를 높게 유지하기가 어렵다는 단점이 있다.

고온 미생물의 특성을 이용한 고온 (45-65°C) 발효에 의한 H_2 생산은 높고 안정된 수소생산의 가능성이 높다고 알려졌다. 혐기상태에서 고온균은 중온(30-40°C)균에 비해 유기물 분해속도가 높으며(4), 고온에서 H_2는 물에 덜 용해하므로 H_2의 부분압을 줄일 수 있어 H_2 생산의 저해를 덜 수가 있다(5, 6). 또한 증류공장, 식품가공공장, 통조림 공장과 같은 곳에서 방출되는 고온 유기성 폐수를 고온 H_2 생산 공정에 바로 활용할 수 있다는 장점이 있다.

혐기성 발효에 의한 H_2 생산에서 주요한 요인은 H_2 생산속도, 수율 (yield), 외부환경변화에 따른 반응기 성능 회복, 그리고 반응기 성능의 장기적 안정성이라고 할 수 있다. 앞의 세 요인들에 대한 정보는 CSTR의 단기운전을 통해 비교적 많이 보고 되었다(1-3). 그러나 반응기의 장기적 안정성에 대한 보고는 드물다. 특히 중온발효에 의한 수소발효에 비해 고온의 경우 아직 보고된 연구가 드물며, 그

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biochemical Engineering, Pusan National University, San 30 Jangjeon-dong, Kumjung-gu, Busan 609-735, Korea
Tel : +82-51-510-2395, Fax : +82-51-512-8563
E-mail : parksh@pusan.ac.kr

나마 발효로 생산된 유기산 또는 반응기내의 미생물에 대한 정보가 없어 반응기 성능에 대한 통합적 해석이 어렵다. 생물막 형태의 미생물을 활용한 고온 trickling biofilter reactor를 사용하여 혐기성 발효에 의한 H_2 생산의 장기 안정성을 조사한 보고가 있긴 하나(7), CSTR system의 장점에도 불구하고 이 system에 의한 H_2 생산의 장기적 안정성에 대해서는 보고 되지 않았다.

그래서 본 연구에서는 실험실 규모의 CSTR을 이용하여 365일간 포도당을 포함하는 합성배지를 이용하여 고온발효에 의한 H_2 생산을 연구하였다. 반응기의 운전변화요인(유기물 부하량, pH, 그리고 온도)에 따른 반응기 성능에 대한 영향을 조사하였으며, 아울러 분자적 기법을 사용하여 미생물 군집변화도 관찰하였다.

재료 및 방법

CSTR 운전

본 연구에서는 pH controller가 장착된 실험실 규모의 working volume 3 L인 5 L (KF-5L, Kobiotech, Korea) CSTR을 사용하였다(Fig. 1). 부산에 위치한 한 하수처리장에서 공급받은 혐기성 소화 슬러지를 CSTR에 식종하였다. 식종 후 초기 균체 농도는 5,350 mg VSS/L이었으며 한편 VSS/TSS는 0.5이었다. 슬러지는 반응기에 식종하기 전에 채 (No. 12; 1.70 mm aperture)로 걸러낸 후에 70°C에서 30분간 열처리하였다. CSTR에는 1.1 L 규모의 pyrex로 된 침전조 (55°C)가 연결되었다. 반응기 내의 biomass를 유지하기위해 침전조안의 biomass는 CSTR로 다시 도입시켰다. Biomass 재순환 속도는 배지 유입속도와 같게 조절하였다.

CSTR는 포도당을 기초로 하는 합성배지(7)를 공급하여 365일간 운전하였으며, 운전기간은 4단계 (phases)로 구성되었다(Fig. 2). 초기 운전기간인 phase I (0-44일)과 그 이후의 반응기 운전조건의 변화에 따른 반응기 성능에 대한 영향을 조사하는 기간인 phases II-IV. Phase II (45-63일)는 포도당 농도, phase III (64-238일)에는 pH, phase IV (239-365일)에는 온도를 각각 변화시켜 그 영향을 조사하였다.

유기물 부하량은 체류시간 (hydraulic retention time, HRT)이나 공급되는 배지의 포도당 농도를 달리하여 조절하였다. HRT는 phase I에서 48 h, 36 h, 그리고 24 h로 순차적 감소를 시켰으며, 그 이후로는 24 h로 일정하게 유지시켰다(Fig. 2). 공급된 배지의 pH는 초기에 6.0에서 순차적으로 5.0으로 감소시켰다. 배지는 N_2 gas (99.999%)로 5분간 처리 후 autoclave로 멸균 처리된 membrane (pore size, 0.45 μm; Sartorius AG, Goettingen, Germany)으로 여과한 후에 반응기로 도입시켰다.

CSTR의 온도는 반응기의 중앙에 설치된 hypodermic thermocouple probe (Cole-Parmer)와 온도계 (Digi-Sense, Cole-Parmer)로 모니터하였다. 조류 (algae)의 성장을 억제하기위해 반응기는 알루미늄 foil로 싸서 빛을 차단하였다. 반응기 운전 조건을 바꿀 때는 18배 이상의 HRT 동안 한 조건하에 반응기를 운전한 후와 가스 농도를 3번 연속 측정하여 같은 값을 나타낼 때를 안정상태로 가정하였다.

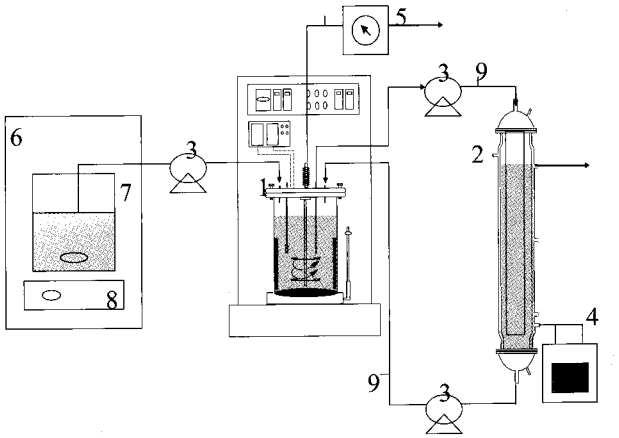

Figure 1. Schematic diagram of CSTR system (1, Fermenter; 2, settler; 3, peristaltic pump; 4, water circulator; 5, gas meter; 6, cold chamber (4°C); 7, feed tank; 8, magnetic stirrer; and 9, sampling port).

분석방법

생산된 biogas의 부피는 wet gas meter (W-NK, Shinagawa, Tokyo, Japan)로 측정하였고, biogas 내의 H_2, CO_2, CH_4, 그리고 N_2 조성은 문헌(7)에 기술된 것과 같이 gas chromatograph로 측정하였다. 유출수 내의 다양한 유기산, ethanol, 그리고 포도당의 농도는 high-performance liquid chromatograph (1100 series, Agilent Technologies, Forster,

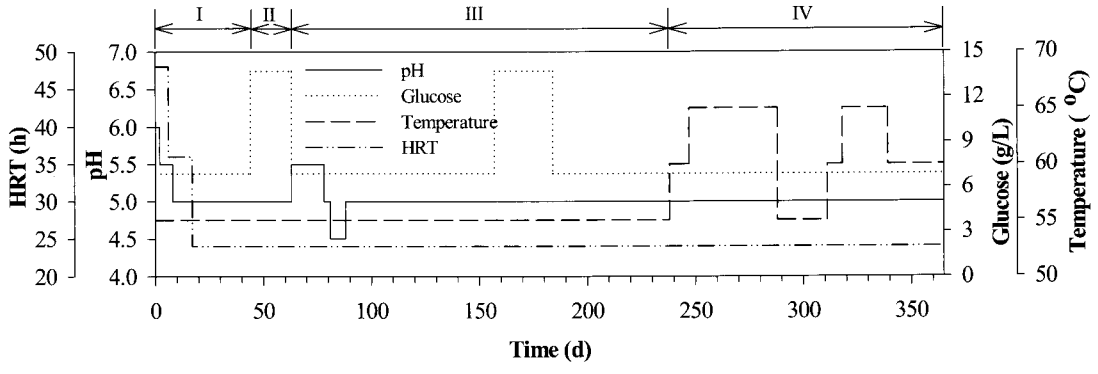

Figure 2. Operational conditions of the thermophilic CSTR used for H_2 production.

CA)로 측정하였다(7). 분석된 유기산은 다음과 같다. succinate, lactate, formate, acetate, propionate, *n*-butyrate, iso-butyrate, *n*-valerate, iso-valerate, 그리고 *n*-caproate. 분석은 각각의 안정상태에서 3번 이상 실시하여 평균하였다. 유출수 내의 biomass (VSS)는 standard methods(8)에 따라 측정하였다.

DNA 추출 및 polymerase chain reaction (PCR)

반응기로부터 취한 6 mL의 유출수를 원심 분리하여 biomass를 획득한 후 phosphate-buffered saline (0.13 M NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2)으로 세척하고, soil DNA isolation kit (Mo Bio Labs. Inc., Solana Beach, CA)을 사용하여 제조회사의 지시대로 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 PCR로 16S rRNA 유전자 단편을 증폭하는데 사용하였다. 이 때 사용된 PCR primers는 357f-GC와 518r(9)이었으며 약 194 bp 크기의 PCR 산물 (*Escherichia coli* numbering에 의해 341-534 위치에 해당)을 얻었다. PCR 산물은 agarose gel 전기영동을 실시하여 그 크기를 확인한 후에 DGGE에 사용하였다.

DGGE 분석

반응기 내의 미생물 군집을 조사하기위해 PCR로 증폭한 16S rRNA 유전자 단편을 사용하여 DGGE를 실시하였다. PCR 산물은 문헌(9)에 기술된 것과 같이 DCode System (Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 분리하였다. 주요 DNA bands는 DGGE gels로부터 잘라내어 PCR로 다시 증폭하고, 증폭된 PCR 산물은 정제 kit (Bioneer Co., Daejeon, Korea)으로 정제한 후에 nucleotide sequencing을 실시하였다. Ribosomal Database Project II의 CHIMERA CHECK program을 이용하여 chimeric sequences를 가진 nucleotide sequences는 스크린 및 배제시켰다. 또한 BLASTN (version 2.2.10)을 이용하여 GenBank database에서 가장 유사한 염기서열을 검색하였다.

결과 및 고찰

CSTR의 start-up

고온 CSTR의 초기 운전기간에 대해서는 다른 보고(10)에서 자세히 다뤘고, 이 연구에서는 장기 운전에 따른 반응기 성능에 초점을 두었다. H_2 생산속도와 H_2 수율의 안정화를 근거로 판단컨대 고온 CSTR의 start-up기간은 30일 이내로 나타나, 중온 CSTR에 비해 짧은 편이었다(1-3, 5, 13).

Phase I 동안 고온 CSTR의 최고 H_2 생산속도와 H_2 수율은 각각 261 mmol H_2/d과 2.4 mol H_2/mol glucose이었다 (Fig. 3 & 4). 문헌과 비교하면, 본 연구의 최고 H_2 수율은 보고 된 중온의 것에 비해 우수한 편이나 최고 수소생산속도는 낮은 편이다(1-3). 낮은 수소생산속도는 유입된 포도당 농도 (6.86 g/L)가 낮고, HRT가 길기 때문인 것으로 판단된다. 이렇게 낮은 포도당 농도를 사용한 것은 수소생산속도가 아닌 수소수율에 본 연구는 초점을 두었기 때문이다.

본 연구에서 식종 슬러지를 열처리하는데 사용한 조건은 메탄생성균을 완전히 제거하는데 불충분하였다. 이는 메탄생성균이 가지는 *mcrA* 유전자가 PCR로 검출되었다는 점과 더불어 운전 초기에 CH_4가 biogas에서 검출(16)되었다는 것으로써 알 수 있었다(Fig. 3). 그러나 gas 분석에서 14

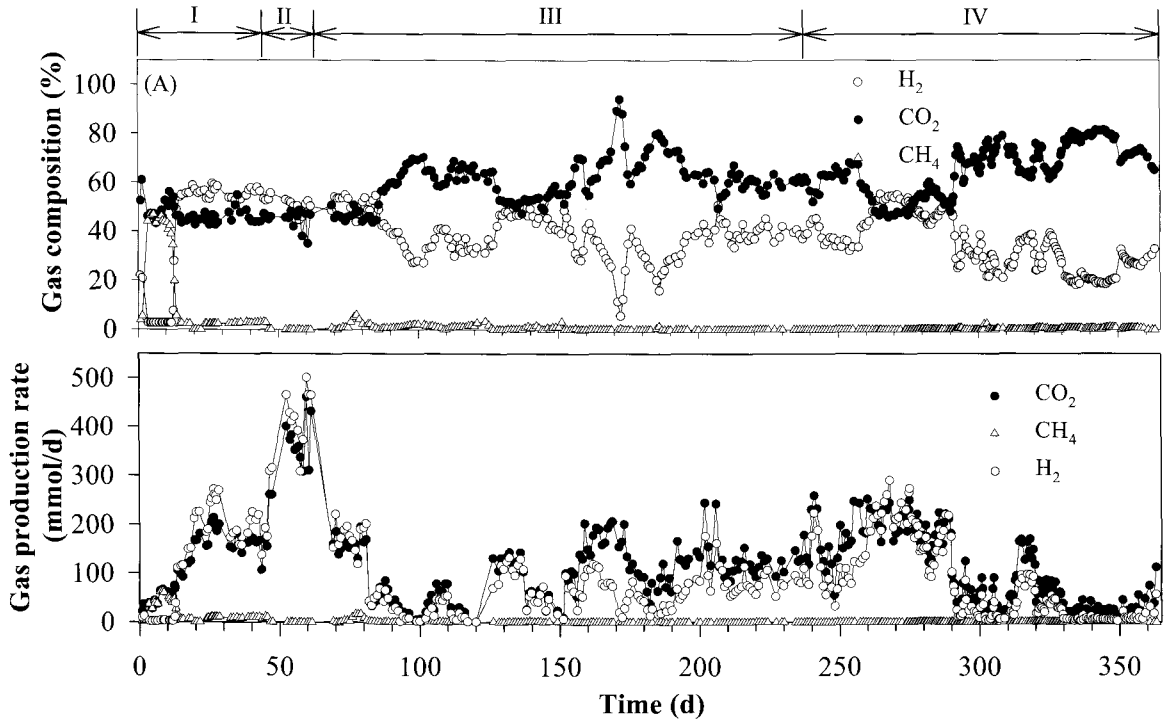

Figure 3. Biogas produced by the thermophilic CSTR.

일부터 CH_4이 거의 검출되지 않거나 많아야 biogas의 5% (77일째 부근) 이하인 것으로 봐서 본 연구에서 사용한 CSTR 조건이 메탄생성균의 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 메탄생성균이 식종균에 남아 있더라도 반응기 운전조건을 통해 메탄 발생을 배제할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 반응기로부터 생산된 biogas의 전형적 조성(v/v)은 H_2가 53 ± 4% 그리고 CO_2는 47 ± 4%였다(Fig. 3).

포도당 농도에 대한 영향

Phase II에서는 HRT는 phase I과 동일하게 24 h로 유지하면서 유입되는 포도당 농도를 13.7 g/L로 2배 증가시킴으로써 유기물 부하량을 2배로 증가시켰다(Fig. 2). 운전조건의 변화로 초기 phase II에서 H_2 생산속도와 수율, 포도당 제거율이 감소(Fig. 3 & 4)한 반면, 유출수내의 lactate 농도가 급격하게 증가하였다(Fig. 5). 시간이 경과함에 따라 H_2 생산속도는 phase I에서 관찰된 최고치의 약 2배인 500 mmol/d까지 증가하였으며 수소 수율은 1.8 mol H_2/mol glucose를 나타냈다. 또한 *n*-butyrate과 acetate가 급격히 증가한 반면 lactate 농도는 급격하게 감소하였다. 감소되었던 포도당 제거율은 100%로 회복되었고 biomass 농도도 증가하였다.

pH에 대한 영향

고온 CSTR은 pH 변화에 매우 민감하게 반응하였다. pH를 5.0에서 4.5로 감소시킴에 따라 H_2 생산속도와 수율, 그리고 포도당 제거율이 급격히 떨어졌고(Fig. 3 & 4), lactate 농도가 현저히 증가하였다(Fig. 5). 포도당이 비교적 분해가 쉬운 당임에도 불구하고 phases II-IV동안 운전조건이 바뀜에 따라 포도당 제거율 떨어지는 경향이 관찰되었다(Fig. 4). 또한 일정한 조건에서 운전하였음에도 불구하고 150일과 300일 부근에서는 포도당 제거율이 변동하였다.

Phase III 초기에 유입되는 포도당 농도를 6.86 g/L로 회복시킨 상태에서 pH를 5.5로 증가시킴에 따라 77일째에는 소량의 CH_4가 검출되었으나(Fig. 3), pH 5.0 이하에서는 CH_4은 검출이 되지 않았다. 메탄생성균에 의해 H_2가 소모되면서 CH_4이 생성될 수 있으므로 메탄생성균의 활성을 억제하기 위하여 pH는 5.0 이하를 유지하는 것이 효과적임을 알 수 있었다. 그러나 pH 4.5에서는 포도당 제거율이 39.1%로 떨어지고 H_2 생산속도와 수율이 급격하게 감소하는 것으로 볼 때 이 조건에서는 H_2 생산균도 활성에 저해를 받는 것으로 여겨진다.

H_2 생산균에 대한 저해를 덜기위해 pH를 4.5에서 5.0로 조절하였으나 H_2 생산속도와 수율, 그리고 포도당 제거율은 증감을 반복하는 불안정한 수치를 나타냈다. 전형적으

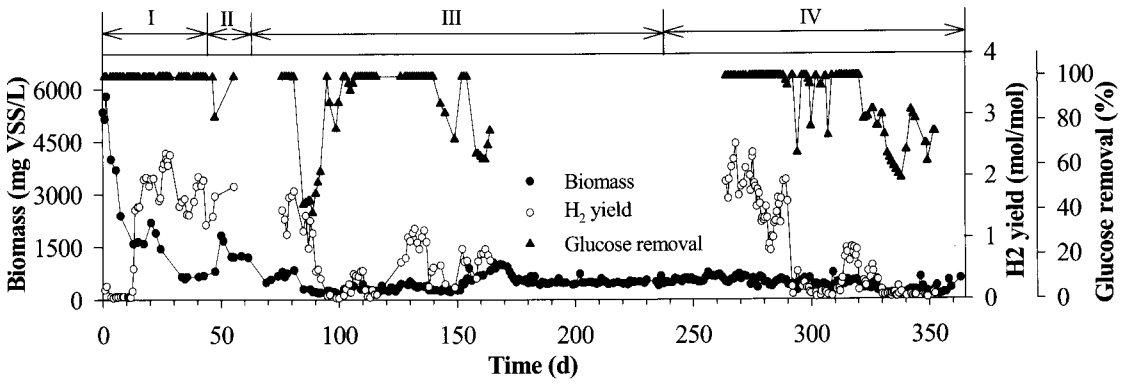

Figure 4. Hydrogen yield, glucose removal, and biomass concentration during the operation of the thermophilic CSTR.

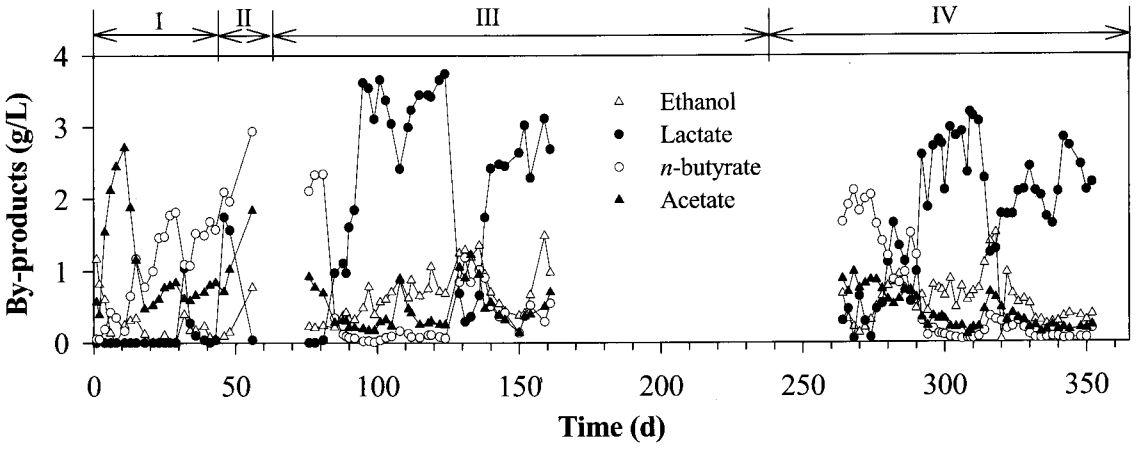

Figure 5. Major metabolites produced by the thermophilic CSTR.

로 biogas의 H_2 함량은 50% 미만으로 감소하였고, 조사된 유기산 중에서 lactate는 여전히 최고치를 나타내었다. 반응기 성능을 호전시키기 위한 한 방편으로 유입 포도당 농도를 증가시킨 후 다시 6.86 g/L로 유지하였다. 이에 따라 H_2 생산속도와 H_2 함량이 증가 되지 않았으나 변동은 줄었다(다른 요인들은 관찰하지 않았음).

온도에 대한 영향

본 연구에서 사용된 고온 CSTR의 경우 pH 변화에 의해 수소생산성이 한번 떨어지면 pH의 변화에 의해서는 성능회복이 매우 어려웠다. 이에 온도를 높게 유지함으로써 H_2 생산을 회복시키고자 하였다. 55°C에서 점차적으로 65°C로 증가시킴에 따라 H_2 생산속도와 수율은 증가하였다. 최고 H_2 생산속도와 수율은 phase I에 관찰된 만큼 나타났으며 lactate에 비해 *n*-butyrate와 acetate의 농도가 상대적으로 높았다.

65°C에서 이러한 반응기 성능회복은 단지 일시적인 것이었고 지속적인 운전시 성능의 계속적 oscillation이 관찰되었다. 다시 온도를 55°C로 낮추었는데, 이 경우 H_2 생산속도와 수율은 급격히 감소하고 포도당 제거율이 불안정하게 되었다. 또한 *n*-butyrate와 acetate의 농도가 감소하는 반면 lactate의 농도가 증가하였다. 다시 온도를 점차적으로 65°C로 올렸지만 수소 수율의 향상은 관찰되지 않았다.

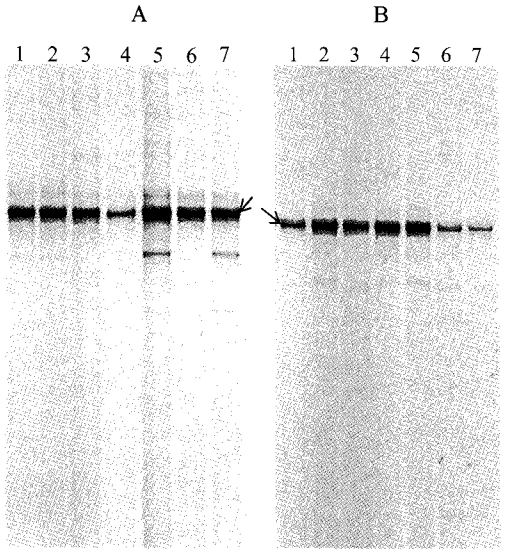

Figure 6. DGGE profiles of PCR-amplified 16S rDNA of thermophilic CSTR samples. Arrows indicate bands whose nucleotide sequences are most closely related with *T. thermosaccharolyticum* (A) Lanes: 1, 56 days; 2, 77 days; 3, 85 days; 4, 101 days; 5, 129 days; 6, 154 days; 7, 164 days. (B) Lanes: 1, 266 days; , 284 days; 3, 302 days; 4, 310 days; 5, 318 days; 6, 336 days; 7, 352 days.

Biomass 농도

초기 biomass 농도 (5,350 mg VSS/L)는 감소하기 시작하여 33일 이후는 평균 487 mg VSS/L를 유지하였다(Fig. 4). Phases II와 III에서 유입되는 포도당의 농도를 증가시킴에 따라 biomass 농도가 50일과 70일경에 1834와 1013 mg VSS/L로 각각 증가되었다가 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 비교적 긴 HRT (48~24 h)와 침전조를 이용한 biomass의 재순환에도 불구하고, 본 연구에서 사용한 포도당의 농도가 낮아 반응기안의 biomass 농도는 다른 중온 반응기에서 보고된 것에 비해 낮은 편이었다. 운전시간이 경과함에 따라 침전조안에서 미생물의 침전성능은 점점 약화되었으며, 그로 인해 침전조안에 침전된 biomass를 반응기내로 재도입하여 유실된 biomass를 보충하고자한 전략은 별 효과가 없었다. 그래서 운전 47일 이후에는 침전조를 제거하였다. 본 연구를 통해 고온 CSTR에 의한 H_2 생산의 경우, 반응기 내의 biomass 농도를 유지하기위해서는 흔히 사용되는 침전조가 아닌 다른 형태의 전략이 필요함을 알 수 있었다.

미생물 군집의 DGGE 분석

반응기 운전 초기 43일간의 운전 기간 동안에 관찰된 biogas 조성 (v/v)은 거의 일정하였으나 미생물 군집조성은 동적인 변화를 나타내었다(10). 또한 반응기내의 미생물 군집조성은 식종균의 그것과는 차이를 나타냈다(10). 초기 운전기간에 관찰된 미생물 군집조성의 동적변화와는 달리 56일부터 취한 시료들의 DGGE gels 은 강하게 염색된 하나의 band를 공통적으로 나타냈었으며 매우 약하게 염색된 몇 개의 bands도 관찰되었다(Fig. 6). 고온 CSTR의 장기운전을 통해 식종균의 미생물군집조성이 변화하였으며 또한 농화배양(enrichment culture)이 일어났음을 분명히 구별되는 band의 관찰을 통해 알 수 있었다. GenBank database를 검색한 결과, 이 주요 band는 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain D120-70 (GenBank accession #, AF247003)의 16S rRNA 유전자와 가장 유사 (99%)한 것으로 나타났다.

DGGE 분석을 통해 *T. thermosaccharolyticum*와 계통발생학적으로 관련된 개체군이 CSTR 조건하에서 상당히 농화배양되었으며 H_2 생산에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 다양한 탄소원과 반응기 형태를 사용하여 H_2 생산을 연구한 이전 보고들(9, 14-16)에서도 *T. thermosaccharolyticum* 관련 균들이 고온 H_2 생산에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었다. 본 연구에서 침전조를 이용해 유실된 biomass를 재순환하여 반응기내 biomass를 유지하고자 한 전략이 효과가 없었던 것은, 이렇게 한 개체군의 우세와 더불어 슬러지 침강에 관련된 다른 균의 점차적인 소실 및 수적 약화에 기인한 것으로 여겨진다.

T. thermosaccharolyticum 의 수소 생산능은 이미 알려졌으며 (11, 12), 고온 H_2 생산에 사용된 혐기성 반응기에서 이 세균과 계통발생학적으로 연관된 균이나 16S rRNA 유전자 단편이 발견되었다고 보고 되었다(9, 14-16). 혐기성 H_2 생산에 사용된 반응기에서는 일반적으로 *Clostridia* 강 (class)에 속하는 미생물이 우점으로 발견되었다(1, 2, 5, 9, 13). 중온 반응기에서는 *Clostridia* 강에 속하는 다양한 미생물들이 보고 되었던 반면, 고온 반응기에서는 *Thermoanaerobacterium* 속 (genus)에 속하는 미생물이 우세한 것으로 보인다.

*T. thermosaccharolyticum*이 포도당을 발효하여 H_2 이외에도 lactate를 생산할 수 있다(11, 12)는 점과 H_2 생산속도와 수율이 낮을 때 마다 본 연구에 사용된 CSTR에서 생산된 유기산 중에서 lactate 농도가 가장 높았다는 점을 감안하면, H_2 생산과 관련이 없는(13) lactate를 생산하는 대사경

로를 피하는 전략의 개발이 필요하다. 그런 전략을 통해 H_2 수율을 증가시킬 수 있을 것이다. H_2를 생산하기위해 생물막 미생물을 이용한 고온 trickling biofilter reactor(7)와 비교하면, 운전 조건 변화 후에 나타난 CSTR의 성능회복에 들어난 문제점 (느린 회복 또는 회복 불능)은 낮은 biomass 농도 또는 반응기 내의 우점 개체군의 대사 변화에 기인하는 것으로 부분적으로 해석할 수 있다.

요 약

1. H_2 생산속도와 H_2 수율의 안정화를 근거로 판단컨대 start-up 기간은 30일 이내로 나타나 중온 CSTR에 비해 짧은 편이었다.
2. 고온 CSTR의 최고 H_2 수율은 2.4 mol H_2/mol glucose로 나타나 보고 된 중온의 것에 비해 우수한 편에 속하였다.
3. 운전 초기에 CH_4이 발생하였으나 14일 이후부터는 pH를 5.0 이하로 유지하면 거의 검출되지 않는 것으로 봐서 메탄생성균이 식종균에 남아 있더라도 반응기 운전 조건을 통해 CH_4 발생을 억제할 수 있었다.
4. 고온 CSTR은 초기 운전 후에 적용한 운전조건의 변화 (유입 포도당 농도, pH, 및 온도)에 민감한 것으로 나타났다. 특히 pH 및 온도변화에 대해 H_2 생산속도와 H_2 수율, 포도당 제거율 면에서 반응기 성능의 감소 및 불안정이 나타나, 운전 조건 변화 후에 나타난 고온 CSTR의 성능회복이 쉽지 않음을 알 수 있었다.
5. 문헌에 보고 된 중온 CSTR과는 달리 고온 CSTR는 일정한 조건에서도 불안정한 성능을 나타내기도 하였다.
6. 불안정한 반응기 성능은 lactate 농도 증가와 더불어 *n*-butyrate와 acetate 농도 감소를 동반하였다. 생산된 *n*-butyrate와 acetate의 농도는 lactate의 농도변화와 반대의 경향을 나타내었다.
7. 비교적 긴 HRT와 침전조를 이용한 biomass의 재순환에도 불구하고, 유입 포도당의 농도가 낮아 biomass 농도는 다른 중온 반응기에서 보고된 것에 비해 낮은 편이었다.
8. *T. thermosaccharolyticum*와 계통발생학적으로 관련된 개체군이 반응기 운전 후 약 40일부터 우점으로 나타나 반응기 성능과 상관없이 그 이후로 계속 우세한 것으로 나타났다.

감 사

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었습니다(KRF-2004-041-D00177).

REFERENCES

1. Das, D. and T. N. Vezirog˘lu (2001), Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *Int. J. Hydrogen Energy* **26**, 13-28.
2. Angenent, L. T., K. Karim, M. H. Al-Dahhan, B. A. Wrenn, and R. Domiguez-Espinosa (2004), Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater, *Trends Biotechnol.* **22**, 477-485.
3. Nath, K. and D. Das (2004), Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 520-529.
4. Zinder, S. H. (1990), Conversion of acetic acid to methane by thermophiles, *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 125-138.
5. Hawkes, F. R., R. Dinsdale, D. L. Hawkes, and I. Hussy (2002), Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1339-1347.
6. van Groenestijn, J. W., J. H. O. Hazewinkel, M. Nienoord, and P. J. T. Bussmann (2002), Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1141-1147.
7. Oh, Y.-K., S.H. Kim, M.-S. Kim, and S. Park (2004), Thermophilic biohydrogen production from glucose with trickling biofilter, *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 690-698.
8. American Public Health Association (1995), Standard methods for examination of water and wastewater. 19th ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
9. Ahn, Y., E.-J. Park, Y.K. Oh, S. Park, G. Webster, and A. J. Weightman (2005), Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production, *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 31-38.
10. Ahn, Y., Y.-K. Oh, and S. Park (2005), Molecular analysis of microorganisms in a thermophilic CSTR used for continuous biohydrogen production, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **20**, 428-434.
11. Lee, C. K. and Z. J. Ordal (1967), Regulatory effect of pyruvate on the glucose metabolism of *Clostridium thermosaccharolyticum, J. Bacteriol.* **94**, 530-536.
12. Ueno, Y., S. Haruta, M. Ishii, and Y. Igarashi (2001), Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora, *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 397-400.
13. Hawkes, F. R., R. Dinsdale, D. L. Hawkes, and I. Hussy (2002), Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1339-1347.
14. Ueno, Y., S. Haruta, M. Ishii, and Y. Igarashi (2001), Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 555-562.
15. Liu, H., T. Zhang, and H. H. Fang (2003), Thermophilic H_2 production from a cellulose-containing wastewater, *Biotechnol. Lett.* **25**, 365-369.
16. Shin, H.-S. and J-.H. Yoon (2005), Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis, *Biodegradation* **16**, 33-44.