

연속 혐기성 수소발효 공정에서 성공적인 start-up 방법

이창규[†]

한국건설기술연구원 수자원, 환경연구본부 환경연구실

Start-up Strategy for the Successful Operation of Continuous Fermentative Hydrogen Production

CHANG-KYU LEE[†]

Environmental Engineering Research Division, Korea Institute of Construction Technology,
(Daehwa-Dong)283, Goyangdae-Ro, Ilsanseo-Gu, Koyang-Si, 411-712, Korea

Abstract >> The variations of performance and metabolites at an early stage were investigated for the successful start-up technology in continuous fermentative hydrogen production. Unsuccessful start-up was observed when the operation mode was changed from batch to continuous mode after the yield was reached to 0.5 mol H₂/mol hexose_{added} by batch mode. H₂ production continued till 12 hours accompanied by butyrate production, but did not last with propionate production increase. It was suspected that the failure was due to the regrowth of propionic acid bacteria during batch mode which were inhibited by heat-shock but not completely killed. Thus, successful start-up was tried by early switchover from batch to continuous operation; continuous operation was started after the H₂ yield was reached to 0.2 mol H₂/mol hexose_{added} by batch mode. Although H₂ production rate decreased at an early stage, stable H₂ yield of 0.8 mol H₂/mol hexose_{added} was achieved after 10 days by lowering down propionate production. And it was also concluded that the reason for H₂ production decrease at an early stage was due to alcohol production by self detoxification mechanism against VFAs accumulation.

Key words : Start-up(시동), Hydrogen(수소), Propionate(프로피온산), Butyrate(뷰틸산), Alcohol(알코올)

1. 서 론

화석연료 분포의 지역적 편재성과 유한성은 유가 상승에 따른 정치적·경제적 문제뿐만 지구온난화를 촉진시키고 있다^{1,2)}. 이러한 상황을 극복하기 위하여 청정에너지원으로 쓰일 수 있는 수소에너지에 대한 연구가 선진국을 중심으로 활발히 진행되고 있다^{3,4)}.

수소생산방법 중 생물학적인 수소생산방법은 크

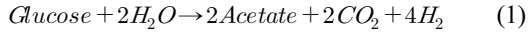
게 광합성과 혐기성 수소발효에 의한 방법으로 나뉜다^{5,6)}. 이 중 혐기성 수소발효는 유기물의 생화학적 분해를 통해 수소를 회수할 수 있는 방법으로서 생산 속도가 매우 빠르며, 유기성폐자원과 같은 저가의 원료를 처리함과 동시에 수소를 회수할 수 있으므로 실용화하는데 긍정적으로 평가되고 있다^{6,7,8,9)}.

혐기성 수소발효는 잘 알려져 있는 혐기성 메탄발효 단계 중 산생성에 의해 생성된 수소가 메탄생성균에 의해 소비되는 과정을 억제하는 것으로 주로 다음의 식(1), (2)의 반응에 의해 수소가 생성된다^{7,8)}.

[†] Corresponding author : changkyu@kict.re.kr

[접수일 : 2013.4.11 수정일 : 2013.4.16 게재확정일 : 2013.4.26]

Copyright © 2013 KHNES



유기산의 생성 시 순수배양을 통해 수소를 생산하는 미생물의 대표종으로 알려져 있는 *Clostridium*을 이용한 수소발효 연구가 가장 활발히 진행되고 있다⁸⁾. *Clostridium*은 메탄 생성균에 비하여 성장 속도가 빠르고, 낮은 pH에서도 잘 성장하며 내생포자를 형성하는 특성이 있으므로, 혐기성 소화조 슬러지, 활성 슬러지, 등을 열처리, 산처리, 알칼리 처리 등을 하여 선택적으로 수소 발효 식종균을 얻을 수 있다^{8,10,11)}.

하지만, 합성폐수를 기질로 이용한 연구 결과를 보면 기질에 열처리를 하였으나 비수소생성균이 초기에는 저해를 받았음에도 불구하고 완전 사멸은 되지 않아, 시간이 지남에 따라 주변 환경조건에 적응을 하면서 수소 생성균과 경쟁을 하는 것을 볼 수 있다. 이러한 문제점들을 극복하기 위해 질산염을 주입하거나, pH를 4.5 이하로 유지하거나, 질소퍼징을 통해 수소분압을 낮추는 등의 다방면의 방법이 시도되었다^{12,13)}.

그러나 혐기성 수소발효에서 효과적인 식종균을 얻기 위한 연구는 많이 진행되었지만, 상대적으로 연속 운전의 시작 방법에 대한 연구는 미진한 편이다. 일반적으로 연속 운전은 식종균을 확보한 후 HRT (Hydraulic retention time)를 점점 줄여가거나, 어느 정도 회분식으로 운전한 후, 미생물의 활성이 좋아지게 되면 연속 운전을 시작하게 된다. Lin은 산처리한 활성 슬러지를 이용하여 HRT를 120시간에서 14시간으로 줄여가면서 효과적인 연속 운전을 시작하였으며, Kim은 열처리한 혐기성 소화조 슬러지를 이용하여 회분식 운전을 통해 주입된 기질 중 0.5mol H₂/mol hexose_{added}의 전환율에 해당하는 수소가 발생된 후에 연속 운전으로 전환하였다. 하지만, 위의 두 연구에서도 초기의 반응조 내 거동 및 부산물의 생산에 대해서는 언급을 하지 않았다^{14,15)}.

본 연구에서는 Kim의 방법에 따라 연속운전을 시도하였으나, 초기에는 수소 생산량이 매우 높게 유지

되었지만, 지속적인 수소 생산은 실패하였으며 오히려 수소가 소모되는 현상까지 관찰되었다. 이와 같은 이유는 Kim의 연구와 본 연구에서 사용한 식종균내에 존재하는 미생물의 종류 및 활성 차이 때문으로 사료되어진다. 하지만, 혐기성 수소 발효 기술의 실용화를 위해서는 식종균은 쉽게 얻을 수 있어야 하며, 지속적인 수소 생성이 가능한 start-up 기술이 필요하다. 그러므로, 본 연구에서는 초기 수소발효조의 반응조 내 거동 및 부산물의 생산을 자세히 관찰하고, 성공적인 start-up을 위한 방법을 제시하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 식종균 및 유입수

식종 슬러지는 대전시 하수처리장 혐기성 소화조 내부 반응관에서 채취하였으며, 농도는 6,000mg VSS/L이다. 소화조의 온도는 35°C이고, 소화조 내 수리학적 체류시간은 25일이다. 메탄 생성균과 같은 수소 소비균 저해 작용을 없애기 위해 채취한 슬러지를 15분 동안 끓인 후, 전체 유효 부피의 30%에 해당하는 슬러지를 식종하였다¹⁵⁾.

유입수의 기질로는 25g COD/L의 농도로 자당이 사용되었으며, NaHCO₃ 1g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L, K₂HPO₄ 0.5g/L, NH₄Cl 4.78g/L, MgCl₂·6H₂O 0.1g/L, CaCl₂·2H₂O 0.01g/L, MnCl₂·6H₂O 0.015g/L, Na₂MoO₄·4H₂O 0.01g/L, FeCl₂·4H₂O 0.05g/L를 첨가하여 배양액을 구성하였다¹⁶⁾.

2.2 반응조의 구성 및 운전방법

반응조의 유효 용량은 5L이며, pH 제어를 위해 pH 조절기를 부착하였는데, 유기산의 축적에 따른 pH의 저하만 우려되므로 3M의 KOH 용액을 제조하였다. 그리고 생성된 기체의 발생량은 수위 변위법을 이용하여 측정하였다.

수소 생성에 적절한 환경을 유지하기 위하여 완전 혼합반응조를 이용하며, pH는 5.3, 수리학적 체류시

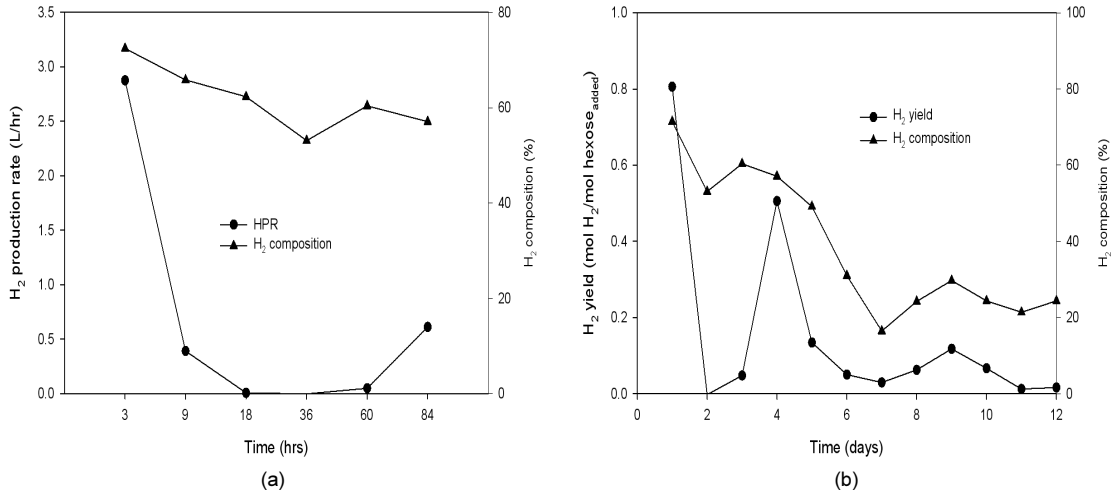


Fig. 1 Short-term (a) and long-term (b) performance of CSTR in unsuccessful start-up

간은 12시간, 교반 속도를 100rpm, 온도는 35°C로 유지하며 운전하였다.

회분식 운전에서 연속운전으로의 전환은 0.5mol H₂/mol hexose_{added}의 전환율에 해당하는 수소가 발생된 후 시작하였으며, 회분식에서 연속운전으로의 빠른 전환을 통하여 성공적인 start-up방법을 시도하였다.

2.3 분석 방법

기체의 조성은 열전도도 검출기를 장착한 가스 크로마토그래피(Gow Mac series 580, USA)를 이용하여 측정하였다. 이 때 칼럼은 N₂, CH₄, CO₂ 분석에는 6ft × 1/8inch 스테인리스 재질의 porapak Q(80/100 mesh), H₂ 분석에는 6ft × 1/8inch 스테인리스 재질의 molecular sieve 5A를 각각 사용하였으며, 운반기체로는 헬륨을 사용하였다. 유기산의 농도는 시료를 0.45µm membrane filter로 거른 후 자외선 검출기(210nm) 고성능 액체 크로마토그래피(Spectrasystem P2000, Spectraphy-sics)로 측정하였으며, 칼럼은 300 × 7.8mm HPX-97H(Aminex), 운반 용매는 0.005M 황산용액을 이용하였다. 알코올 분석에는 전기화학 검출기(ED50A, Dionex) 고성능 액체 크로마토그래피(DX-600, Dionex)를 이용하였으며 칼럼은 250 × 4mm

Carbopac PA10(Dionex), 운반 용매는 0.01M 수산화 나트륨용액을 사용하였다. COD는 dichromate reflux method를 이용하여 측정하며, SS 및 VSS는 Standard Methods(APHA, 1998)에 준하여 측정 및 분석하였다¹⁷⁾. 그리고, 유입수와 유출수의 당 농도는 페놀-황산 방법에 의하여 구하였다¹⁸⁾.

3. 재료 및 방법

3.1 Start-up 실패 시 반응조 내 거동 특성

Fig. 1은 회분식 운전에 의해 주입된 기질의 0.5mol H₂/mol hexose_{added}의 전환율에 해당하는 수소가 발생된 후 연속 운전으로 전환하는 시점을 기준으로 초기의 수소 생산속도 및 12일간의 수소 전환율을 보여준다. 연속 운전 전환 후 수소 생산 속도가 급격히 감소하였으며, 심지어 18~60시간 사이에서는 수소가 소모되는 반응도 관찰되었다. 연속 운전 4일 후 수소 전환율이 0.5mol H₂/mol hexose_{added} 정도로 증가하였지만, 다시 감소를 하여 수소가 거의 발생되지 않았고, 메탄은 전혀 검출되지 않았다.

수소 생산은 유기산의 생산과 수반되므로 유기산의 농도 및 분포는 수소 생산을 모니터링하는 유용

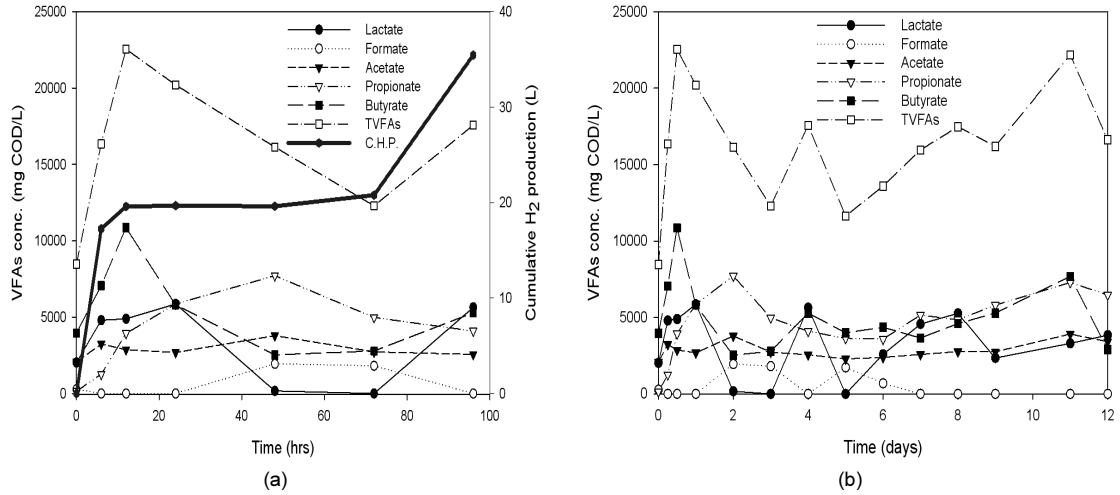
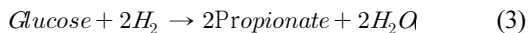


Fig. 2 Short-term (a) and long-term (b) VFAs production in unsuccessful start-up

한 지표로 쓰이며, 일반적으로 혼합배양 시 부틸산의 생산과 수소 생산은 밀접한 관계가 있다고 보고되고 있다^{15,16}. Fig. 2는 연속운전 전환 후 초기 4일 및 12일간의 유기산의 농도 변화이다. 회분식 운전에 의해 부틸산은 4,000mg COD/L 정도의 농도로 생산되었으며, 12시간까지 부틸산의 농도가 급격히 증가하면서 수소발생량도 동시에 증가하였다. 하지만, 72시간까지는 부틸산의 농도가 떨어진 반면 프로피온산의 농도가 상대적으로 증가하면서 수소도 생산되지 않았다. 그 후 다시 부틸산의 농도가 약간 증가하면서 수소 생산이 약간 회복되었지만, 프로피온산의 농도가 5,000mg COD/L 이상으로 유지되면서 수소가 생산되지 않았다.

프로피온산은 포자를 생성할 수 있는 *Clostridium*에 의해서도 생산이 되지만, 일반적으로 비포자 생성균인 *Selenomonas*, *Propionibacteria*, *Bifidobacteria*에 의해서 생산된다고 알려져 있으며, 다음의 식(3), (4)와 같이 수소를 소모하거나, 젖산의 분해를 통해 생성된다고 한다^{13,19,20}.



특히 *Propionibacteria*는 박테리옌을 분비하여 다른 미생물의 성장에 저해를 준다고 보고되고 있다²¹. 회분식 운전 후 프로피온산의 농도가 매우 작았던 것을 보면 열처리에 의해 프로피온산 미생물들의 대부분이 사멸하고 저해를 받았지만, 시간이 지남에 따라 그 활성을 회복하여 증식함으로써 수소 생성균과 경쟁을 하거나 저해작용을 주어 수소생산이 지속적으로 유지되지 않았다고 판단된다.

3.2 성공적인 start-up에서의 반응조 내 거동 특성

Fig. 3은 회분식 운전에 의해 주입된 기질의 0.2mol H₂/mol hexose_{added}의 전환율에 해당하는 수소가 발생된 후 연속 운전으로 전환하는 시점을 기준으로 초기의 수소 생산속도 및 약 25일간의 수소 전환율을 보여준다. 연속 운전으로 전환 후 실패했을 때와 마찬가지로 수소 생산 속도가 감소되었지만, 36시간 이후 다시 증가하였으며, 10일 이후부터는 0.8mol H₂/mol hexose_{added}에 해당하는 수소가 지속적으로 발생하였다.

Fig. 4는 연속운전 전환 후 초기 4일 및 25일간의 유기산의 농도 변화이다. 실패했을 때와 마찬가지로 12시간까지 부틸산의 농도가 급격히 증가하면서 수

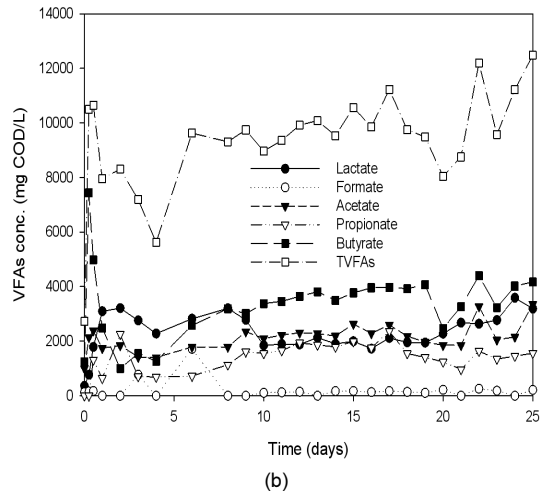
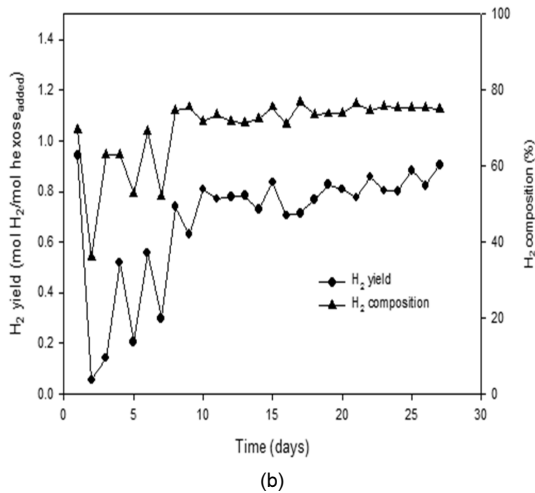
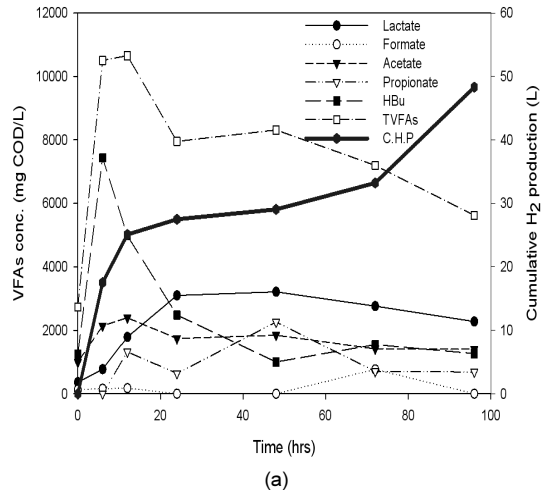
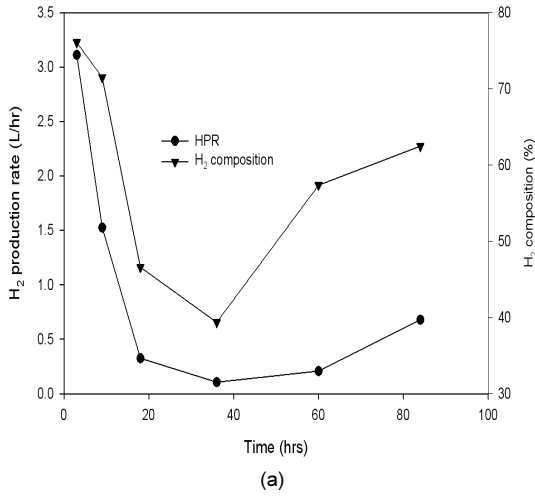


Fig. 3 Short-term (a) and long-term (b) performance of CSTR in successful start-up

Fig. 4 Short-term (a) and long-term (b) VFAs production in successful start-up

소발생량도 동시에 증가하였지만, 그 이후 뷰틸산의 농도가 급격히 떨어지면서 수소발생량이 감소하였다. 하지만, 실패했을 때와는 다르게 프로피온산의 농도가 2,000mg COD/L 이하로 유지되었으며, 이에 따라 지속적인 수소 생성이 가능하였다.

3.3 start-up 초반의 급격한 수소생산 저해의 원인

성공적인 start-up의 경우에도 초반에 급격히 수소생산 속도가 감소하는 것이 뷰틸산의 농도가 감소하는 반면 프로피온산 농도가 증가하였기 때문이기도

하지만, 전체 유기산의 농도가 급격히 감소하였으므로 알코올의 생산량이 증가하였을 것으로 판단되었다.

Fig. 5는 0.2mol H₂/mol hexose_{added}에 해당하는 수소가 발생된 후 시간에 따른 알코올 및 전체 유기산의 농도를 보여준다. 0.5일까지 유기산의 농도는 10,000mg COD/L 이상으로 급격히 증가한 후, 연속 운전 4일까지 지속적으로 감소된 반면, 알코올 농도는 5,000mg COD/L까지 증가되었으며, 알코올의 대부분은 에탄올로 구성되었고, 5일 이후부터 유기산 및 알코올 농도의 큰 변화는 있지 않았다.

수소생성균인 *Clostridium*은 일반적으로 뷰틸산과

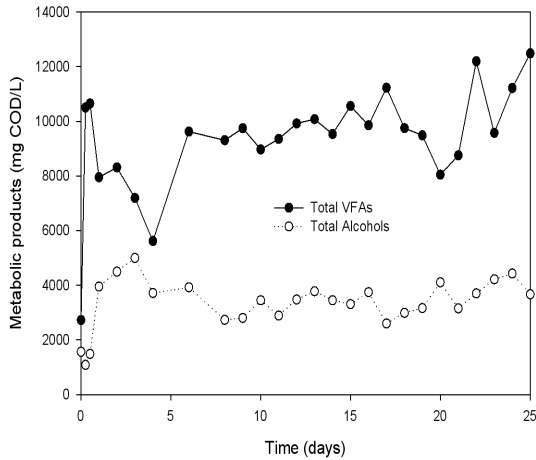


Fig. 5 Variations of metabolic products in successful start-up

아세트산의 생성과 함께 수소를 생성하며, 알코올을 생성할 경우에는 수소가 생성되지 않는다고 보고되고 있다. 알코올은 pH가 낮거나, 수소분압이 높거나, 유기산이 축적될 경우에 그 생성량이 늘어나고, 회분식 운전의 경우에 알코올은 미생물의 성장 속도가 감소할 때 생성된다고 보고되고 있다^{22,23}. *Clostridium*이 뷰틸산이나 아세트산을 생성 시에는 1몰의 글루코스로부터 각각 3몰과 4몰의 ATP를 얻지만, 알코올 생성시에는 2몰의 ATP를 얻는다. 더 작은 양의 에너지를 얻음에도 불구하고, *Clostridium*이 알코올을 생성하는 이유는 자기방어적으로 고농도의 유기산의 축적에 따른 미생물체내로의 유기산 침투에 의한 독성을 줄이기 위한 것이 가장 큰 이유이며, 뷰틸산과 아세트산을 소모하면서 포도당과 결합하여 알코올을 생성하는 반응도 있다고 한다²³.

특히 여러 가지 유기산 중 뷰틸산의 독성이 가장 크다고 보고되는 연구 결과가 많으며, 해리되지 않은 뷰틸산의 경우 미생물체내에 들어가 해리된 후 양자가 생산되어 pH를 낮추는 효과가 부과되므로 더 큰 영향을 끼친다고 한다^{24,25}. 본 실험에서 pH는 5.3으로 제어를 하였는데, 뷰틸산의 pKa값은 표준상태에서 4.81로 프로피온산(pKa=4.87)을 제외하고는 다른 유기산(아세트산=4.76, 젖산=3.86, 포름산=3.75)에 비하여 높은 편으로, 해리되지 않은 상태로 존재하는

부분이 상대적으로 많은 편이다.

이와 같은 내용을 살펴보았을 때, 초반의 수소 생산 저하는 프로피온산 미생물의 재증식 및 유기산의 축적에 따른 독성을 막기 위한 미생물의 자기방어적인 알코올의 생산 때문이며, 강제적인 유기산 추출법 등을 통해 수소 생산 속도를 유지할 수 있을 것으로 사료된다^{26,27}.

4. 결 론

열처리한 슬러지를 식중균으로 이용 시, 회분식 운전에서 연속 운전으로의 빠른 전환을 통해 start-up을 성공하였으며, 반응조 내 거동 및 부산물 생성을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 기존의 연구결과를 참고하여 회분식 운전을 통해 $0.5 \text{ mol H}_2/\text{mol hexose}_{\text{added}}$ 의 전환율에 해당하는 수소가 발생한 후 연속 운전으로 전환하였을 경우, 지속적인 수소 생산에 실패하였으며, 이는 프로피온산 미생물이 열처리에 의하여 대부분이 사멸하였지만, 회분식 운전 기간동안 재증식하여 수소 생성균과 경쟁하였기 때문이다.
- 2) 회분식 운전에서 연속 운전으로의 빠른 전환($0.5 \rightarrow 0.2 \text{ mol H}_2/\text{mol hexose}_{\text{added}}$)은 프로피온산 생산을 억제하여 지속적인 수소 생산을 가능하게 하였다.
- 3) 연속 운전 초기의 급격한 유기산 및 알코올 농도의 변화와 함께 수반되는 수소 생산 저하는 프로피온산 농도의 증가 및 유기산의 축적에 따른 독성을 막기 위한 미생물의 자기방어적인 알코올의 생산 때문이다.

후 기

본 연구는 한국건설기술연구원 주요사업((12주요-임무) 마이크로그리드 물 재이용 기술 개발(2차)(2012-0016-1-1))의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

Acknowledgement

This research was supported by a grant from a Strategic Research Project (Water Reuse Technology for Smart Water Micro-Grids, Code # 2012-0016-1-1) funded by the Korea Institute of Construction Technology.

참 고 문 헌

- O. Elsharnouby, H. Hafez, G. Nakhla, M. H. E. Nagggar, "Acritical literature review on biohydrogen production by pure cultures", *Int. J. hydrogen energy*, Vol. 38, 2013, pp. 4945-4966.
- S. Rittmann, C. Herwig, "A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production", *Microbial Cell Factories*, Vol. 11, 2012.
- T. Serra, D. Zilberman, "Biofuel-related price transmission literature: A review", *Energy Economics*, Vol. 37, 2013, pp. 141-151.
- F. R. Hawkes, I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale, D. L. Hawkes, "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress", *Int. J. hydrogen energy*, Vol. 32, 2007, pp. 172-184.
- M. S. Kim, D. H. Kim, J. K. Lee, *Comprehensive biotechnology*, Second Edition, Vol. 3, 2011, pp. 115-125.
- X. M. Guo, E. Trably, E. Latrille, H. Carrere, J. Steyer, "Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review", *Int. J. hydrogen energy*, Vol. 35, 2010, pp. 10660-10673.
- P. C. Hallenbeck, "Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis", *Int. J. Hydrogen. Energ.*, Vol. 34, 2009, pp. 7379-7389.
- Y. M. Yun, K. W. Jung, D. H. Kim, Y. K. Oh, H. S. Shin, "Microalgal biomass as a feedstock for biohydrogen production". *Int. J. hydrogen energy*, Vol. 37, 2012, pp. 15533-15539.
- D. H. Kim, M. K. Lee, S. Y. Lim, M. S. Kim, "Dark fermentative hydrogen production using the wastewater generated from food waste recycling facilities", *Tans. of the Korean Society of Hydrogen Energy*, Vol. 22, No.3, 2011, pp. 580-586.
- C. Lin, and C. Jo, "Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, Vol. 78, 2003, pp. 678-684.
- Z. X. Song, Y. Dai, Q. L. Fan, X. H. Li, Y. T. Fan, H. W. Hou, "Effects of pretreatment method of natural bacteria source on microbial community and bio-hydrogen production by dark fermentation", *Int. J. hydrogen energy*, Vol. 37, 2012, pp. 5631-5636.
- E. Kan, "Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation", *Renewable Energy*, Vol. 49, 2013, pp. 227-231.
- D. H. Kim, S. H. Kim, H. S. Shin, "Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition", *Enzyme and Microbial Technol.*, Vol. 45, 2009, pp. 181-187.
- C. Y. Lin, and C. H. Chou, "Anaerobic hydrogen production from sucrose using an acid-enriched sewage sludge microflora", *Eng. Life Sci.*, Vol. 4, No. 1, 2004, pp. 66-70.
- S. H. Kim, S. K. Han, and H. S. Shin, "Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter", *Process Biochem*, Vol. 41, 2006, pp. 199-207.
- M. Cui, J. Shen, "Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation", *Int. J. Hydrogen. Energ.*, Vol. 37, 2012, pp. 1120-1124.
- APHA, AWWA and WEF, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Baltimore, 1998, pp. 2-57-2-59.
- M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colormetric method for determination of sugars and related substances",

- Anal. Chem., Vol. 28, No. 3, 1956, pp. 350-356.
19. Y. Itoh, K. Tada, T. Kanno, J. Horiuchi, "Selective production of lactic acid in continuous anaerobic acidogenesis by extremely low pH operation", *J. of Biosci. and Bioeng.*, Vol. 114, 2012, pp. 537-539.
 20. Online textbook of bacteriology at the University of Wisconsin-Madison, <http://textbookofbacteriology.net/metabolism.html>, January(2006).
 21. H. Holo, T. Faye, D. A. Brede, T. Nilsen, I. Ødegard, T. Lansurd, J. Brendehaug, and I.F. Nes, "Bacteriocins of propionic acid bacteria", *Leit*, Vol. 82, 2002, pp. 59-68.
 22. B. P. Tracy, S. W. Jones, A. G. Fast, D. C. Indurthi, E. T. Papoutsakis, "Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications", *Current Opinion in Biotechno.*, Vol. 23, 2012, pp. 364-381.
 23. M. Sauer, D. Porro, D. Mattanovich, P. Branduardi, "Microbial production of organic acids: expanding the markets", *Trends in biotech.*, Vol. 26, 2008, pp. 100-108.
 24. X. J. Zheng, H. Q. Yu, "Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures", *J. of Environ. Manag.*, Vol. 74, 2005, pp. 65-70.
 25. J. C. Van den Heuval, H. H. Beeftink, and P. G. Verschuren, "Inhibition of the acidogenic dissimilation of glucose in anaerobic continuous cultures by free butyric acid", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 29, 1988, pp. 89-94.
 26. D. Vandák, J. Zígová, E. Šturdík, and Š Schlosser, "Evaluation of solvent and pH for extractive fermentation of butyric acid", *Process Biochem.*, Vol. 32, No. 3, 1997, pp. 245-251.
 27. J. Zígová, E. Šturdík, D. Vandák, and Š Schlosser, "Butyric acid production by *Clostridium* with integrated extraction and pertraction", *Process Biochem.*, Vol. 34, 1999, pp. 835-843.