

실규모 UASB반응조 내부 계층화된 혐기성 그래놀의 물리화학적 & 생물학적 특성 조사

조홍목^a, 김민상^a, 신승구^b, 조시경[†]

Physico-chemical and biological characteristic analysis of stratified anaerobic granules in a full-scale UASB reactor

Hongmok Jo^a, Minsang Kim^a, Seung Gu Shin^b, Si-Kyung Cho[†]

(Received: Nov. 28, 2021 / Revised: Dec. 8, 2021/ Accepted: Dec. 9, 2021)

ABSTRACT: In this study, the physico-chemical and biological characteristics of anaerobic granular sludge at different heights of a full-scale UASB reactor (UASBr) were investigated. Granular sludge was taken from 1 m, 2 m, and 3 m above the ground level in the UASBr. The morphological analysis showed that the upper part had bigger granules and the lower part had rounder granules. The ANOVA test confirmed that the mean size and the roundness of the granules had statistically significant difference along the height at 95% confidence level, and there was a significant negative linear relationship between the size and roundness ($r=-0.40$, $p<0.05$). A SMA test using acetic, propionic and butyric acids showed that granules from 2 m height had the highest specific methanogenic activity. The EPS contents were also unequal to each height, with 2 m showing the highest content. These findings could be helpful to understand the different characteristics of stratified anaerobic granules in full-scale UASBr and maintain the reactor performance.

Keywords: Anaerobic digestion, UASBr, Stratification, Granular sludge, SMA test, ANOVA

초 록: 본 연구에서는 실규모 UASB 소화조에서 높이에 따른 그래놀 슬러지의 물리화학·생물학적 특성에 대해 조사하였다. 혐기성 그래놀은 UASB 반응조에서 지상으로부터 1 m 높이별(1 m, 2 m, 3 m)로 채취하였다. 형태학적 분석결과, 그래놀의 크기는 소화조의 상단부로 갈수록 커졌고 원형율(roundness)은 하단부에서 더 둥근 형태를 나타내었다. ANOVA 검정 결과, 그래놀의 평균 크기와 원형율은 95% 신뢰수준에서 통계적으로 유의한 차이를 보였고 두 변수 사이에 유의한 음의 상관관계가 있는 것으로 나타났다($r=-0.40$, $p<0.05$). 아세트산, 프로피온산, 부틸산을 기질로 사용한 SMA test 결과에서는 2 m 높이에서 채취한 그래놀의 비메탄활성도가 가장 높았다. EPS의 경우 높이에 따라 함량이 다양하게 나타났으며 2 m에서 가장 높았다. 본 실험의 결과를 통해 높이별 그래놀 슬러지의 특성을 이해하고 소화조의 유지관리 및 성능 개선에 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

주제어: 혐기성 소화, UASBr, 계층화, 그래놀 슬러지, SMA test, ANOVA

^a 동국대학교 바이오환경과학과 박사과정(Doctor's course, Department of environmental science, Dongguk University)

^b 경상국립대학교 에너지공학과 부교수 미래융복합기술연구소(Associate Professor, Department of Energy Engineering, Future Convergence Technology Research Institute, Gyeongsang National University)

^c 동국대학교 바이오환경과학과 부교수(Associate Professor, Department of environmental science, Dongguk University)

† Corresponding author(e-mail: sk.cho@dgu.ac.kr)

1. 서론

혐기성 소화는 고농도 유기성 폐기물을 처리하는 과정에서 호기성 미생물을 이용한 처리공정에 비해 슬러지 발생량이 적고 운전비용이 저렴하고, 생산된 메탄가스를 추가적인 발전이나 열에너지로 활용할 수 있는 장점이 있다. 또한, 화석연료의 과다 사용으로 인해 배출되는 온실가스를 저감할 수 있어, 세계적으로 혐기성 소화공정의 효율을 증가시키기 위한 다양한 연구들이 보고되고 있다.¹⁾ 혐기성 소화를 위한 반응조의 형태 중 UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) 반응조는 기질을 하단부로 주입하여 상향류를 만들고 내부의 혐기성 미생물을 그레놀(Granule)의 형태로 침강시켜 반응조 내 높은 미생물농도 유지가 가능하여 유기물의 고율 및 고효율 처리가 가능한 생물 반응조이다. 일반적으로 기질이 상단부로 올라가는 구조로 되어 있기 때문에 높이가 높은 원통형의 비교적 단순한 구조를 사용하며 하수나 주정폐수와 같은 고농도의 액상 유기성 폐기물을 처리에 사용되는 것이 특징이다.²⁾ 반응조 내부에서 혐기성 미생물들이 스스로 뭉치고 군체를 형성하는 세포 응집체를 생물학적 그레놀(Biological granule)이라고 한다. 다수의 미생물들이 물리 화학적 및 화학적 상호 작용을 통해 그레놀화 되면 밀도가 높고 강한 구조, 높은 침전성, 환경변화에 대한 적응 능력이 증가되어 고농도의 폐기물 처리가 가능할 뿐 아니라 상대적으로 짧은 체류시간에도 안정적인 운전이 가능한 것으로 보고되고 있다.³⁾

그레놀의 크기는 일반적으로 0.6~1.5 mm 사이에 분포하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 이는 UASB 반응조 내부 슬러지의 밀집도와 미생물의 활동 가능 반경의 차이에 의해서 그레놀 슬러지의 밀집도가 높고 양이 많을 경우 활동 가능 반경이 좁기 때문에 그레놀의 크기가 작아지지만, 반대로 슬러지의 밀집도가 낮고 미생물의 활동 가능 반경이 넓어지면 그레놀의 크기도 커지기 때문이다.⁵⁾ 소화조 내 기질의 유입이나 메탄가스 발생으로 인한 입자의 이동과 같은 외부의 물리적 이동 요인이 발생하게 되면 마찰과 압밀(Consolidation)로 크기에 변화가 생기거나 크기가 큰 입자는 상단부로 작은 입자는 하단부로 분리되는 현상인 “Brazil nut effect”가 발생한다는 연구들이 보고된바 있다.^{6,7)} 따

라서 그레놀이 분포하는 위치 혹은 높이에 따라 특성이 달라지고 소화조의 운전 효율에 영향을 미치기 때문에 메탄 생성 그레놀의 형태와 구조 등 물리화학적 특성과 활성도, 미생물 군집과 같은 생물학적인 특성 파악을 통해 심도 있는 분석이 필요하다.^{8,9)}

본 연구에서는 실규모 UASB 소화조 내부의 혐기성 그레놀을 높이별로 채취하여 이미지 분석 프로그램인 CMEIAS를 통해 그레놀의 입도 분석과 ANOVA (Analysis of Variance), 상관관계를 분석하였다. 추가적으로 비메탄활성도(SMA, Specific Methanogenic Activity) 실험을 통해 높이별 그레놀의 활성도를 측정함으로써, 실규모 반응조 내에서 계층화된 혐기성 그레놀의 물리화학적, 생물학적 특성을 조사하는 것을 목적으로 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 혐기성 그레놀 슬러지

혐기성 그레놀은 C시에 있는 맥주공장 내 주정폐수 처리시설에 있는 혐기성 소화조 내부에서 채취하였다. 높이에 따른 그레놀의 생물학적, 물리화학적 특성을 알아보기 위해 높이 6.9 m의 UASB 반응조 내부에서 대다수의 혐기성 그레놀이 분포할 것으로 판단되는 높이를 고려하여 총 3개의 시료 (1M: 1 m 높이, 2M: 2 m 높이, 3M: 3 m 높이)를 채취하였으며, 성상은 Table 1과 같았다.

2.2. SMA (Specific Methanogenic Activity) 실험

혐기성 소화공정에서 메탄생성균의 활성도를 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있는 SMA 실험

Table 1. Characteristics of Granular Sludge at Each Height

	1M	2M	3M
TS (g/L)	49.1	36.4	39.2
FS (g/L)	5.5	4.5	5.2
VS (g/L)	43.6	31.9	34
VSS (g/L)	33.6	21.9	24

을 진행하였다. 채취한 그레놀을 Serum bottle에 넣고 기질로서 1 g COD기준 Acetic acid, Propionic acid, Butyric acid를 각각 주입하고, 가스 발생량이 많은 실험 초기에는 3시간 간격으로 메탄 발생량을 확인하였으며, 6일째부터는 발생하는 가스량을 고려하여 샘플링 간격을 조절하였다. 발생된 바이오가스는 가스 크로마토그래프(Gow-Mac series 580, Gow-Mac instrument Co.)를 사용하여 Column은 Hayesep Q 80/100 mesh, Carrier gas는 고순도 질소가스를 이용하여 메탄성분을 측정하였다. 미생물 성장에 필요한 미량원소는 Table 2와 같이 주입하고 실제 메탄 발생량을 표준상태 (STP, Standard Temperature and Pressure)로 환산한 뒤 비교하였다.¹⁰⁾

2.3. 체외 고분자 물질 (EPS, Extracellular Polymeric Substance) 분석

혐기성 그레놀의 물리화학적 특성을 조사하기 위해 그레놀의 초기 생성과정 및 그레놀 강도에 직접적인 영향을 주는 것으로 보고되고 있는 EPS 농도를 분석하였다. 이를 위해, 탄수화물 정량에는 Phenol-sulfuric 분석법을 사용하였고, 단백질 정량에는 Hartree-Lowry protein assay를 이용하였다.^{11,12)}

2.4. 형태 및 통계 분석

그레놀의 입도 분석은 CMEIAS (Center for Microbial Ecology Image Analysis System ver. 1.28) 프로그램

Table 2. Composition of the Trace Elements Supplemented to the Incubation

Compound used		Element concentration(mg/L)
Mineral salts	MgCl ₂ · 6H ₂ O	100
	CaCl ₂ · 6H ₂ O	75
Trace metals	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂	0.0087
	H ₃ BO ₃	0.05
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.5
	ZnCl ₂	0.05
	CuCl	0.0221
	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.05
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.7
	NaSeO ₃	0.05

사용하였다.¹³⁾ 그레놀 샘플들은 0.2 mm 체에서 세척하였고 1500~1900개의 시료를 500~700개씩 나누어 모두 촬영하였다. 이후, 촬영된 사진 이미지를 변환하여 CMEIAS 프로그램에 업로드하여 형태분석을 진행하였으며, 측정된 면적을 바탕으로 크기는 $\sqrt{4Area/\pi}$ 식을 이용하였고, 원형율(Roundness)은 $4\pi Area/Perimeter^2$ 로 계산하였다. 원형율의 경우 얼마나 구(Sphere)에 가까운 모양인지를 나타내는 0~1 사이의 무차원 수로, 1에 가까울수록 원형에 근접함을 의미한다. ANOVA 및 상관분석(Correlation analysis)은 SPSS ver. 23를 이용하였으며, 0.05의 유의수준으로 수행하였다.¹⁴⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. Morphological Analysis

실제 맥주 공장에서 운영 중인 폐수 처리 시설에서 1 m 높이 간격으로 그레놀을 채취하여 CMEIAS 프로그램을 이용해 그레놀의 크기와 원형율에 대해 측정하였다. 높이에 따라 채취한 그레놀의 수는 1M, 2M, 3M에서 각각 1599개, 1705개, 1900개를 분석하였고 사분위수를 이용하여 이상치(Outlier)를 제거하였다. 1 m 높이에서 채취한 그레놀들의 크기는 76.11%가 0.5 mm 이하였으며, 2 m 및 3 m 높이에서는 각각 49.33% 및 48.79%의 그레놀들이 0.5 mm 이하로 분포함을 확인하였다(Fig. 1). 일반적으로 UASB 소화조에서는 0.05~

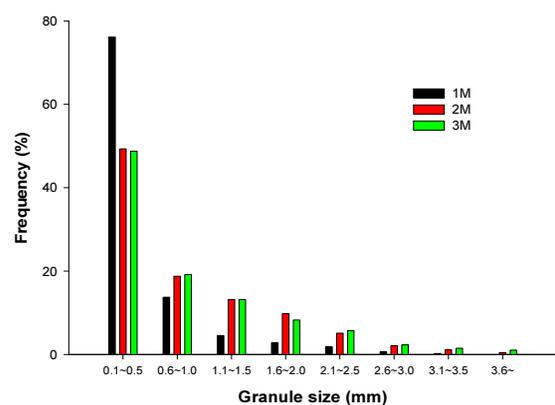


Fig. 1. Size distribution of granules at different heights.

6 mm의 다양한 크기의 그레놀이 분포하며, 전체에서 절반 이상의 그레놀이 0.5 mm의 크기에 분포한다고 보고되어¹⁵⁾ 기존 연구결과들과 유사한 경향을 보이는 것으로 확인되었다.

그레놀 크기의 평균값은 1M에서는 0.51 mm, 2M과 3M에서는 각각 0.84 mm, 0.90 mm를 나타냈으며 전체 그레놀의 평균 크기는 0.75 mm로 확인되었다. 1M에서 상대적으로 작은 그레놀이 많이 존재했던 이유는 반응조 특성 상 그레놀들이 하부에 다수 존재하고 있어 그레놀간 마찰 및 압밀에 의한 것으로 판단된다. 추가적으로, 장기간 운전이 진행되어도 대부분의 그레놀이 특정 범위의 크기로 존재하는 이유는 물리적인 힘 외에도 Multi-layer 이론 및 내부로의 물질 전달율에 따른 유효두께의 개념으로 설명할 수 있다. 가장 외부에 위치한 층부터 기질을 가수분해하여 중간산물을 중간층에 존재하는 Acetogenic bacteria에게 전달하고, 전환된 Acetate, CO₂ 및 H₂가 메탄생성균이 존재하는 중심부로 전달되어 메탄으로 전환되는 과정에서 과도한 크기로 성장하게 되면 그레놀 내부로의 물질 확산에 한계가 생길 수 있기 때문으로 판단된다.⁹⁾

그레놀의 크기가 채취 높이별로 통계적 차이가 있는지 확인하기 위해 ANOVA (One-way)를 진행한 결과, Levene's test에서 유의확률(p -value)이 0.05보다 크기 때문에 등분산을 만족하는 것을 확인하였고 그룹간의 통계량이 95%의 신뢰구간에서 F -value는 42.34, p -value는 0.001 이하로 유의한 차이가 있다는 것이 확인되었다(Table 3). Duncan's multiple range test에서 2M 및 3M의 그레놀은 서로 큰 차이가 없는 것으로 나타나 동일한 집단으로 분류되었지만 1M은 다른 크기 분

포를 나타내어 단독으로 하나의 집단으로 분류되었다.

그레놀의 원형율도 크기와 같은 방법으로 통계적 차이를 확인하였다. 높이별 모든 그레놀의 원형율 평균은 1M, 2M, 3M에서 각각 0.81, 0.75 및 0.72로, 1M이 구형에 가장 가까운 모양을 하는 것으로 나타났다. Levene's test에서는 유의수준 0.178로 등분산을 만족하였고 F -value는 98.62, p -value는 0.001 이하였으며, Duncan's multiple range test에서는 높이에 따른 그룹 모두가 차이가 있다는 결과를 얻었다.

그레놀 형태학적 요소인 크기와 원형율을 분석하고 두 가지 요소 사이에 연관성이 있는지 알아보기 위해 상관분석을 진행한 결과, Pearson correlation coefficient는 -0.40 ($p < 0.05$), Spearman's correlation coefficient는 -0.45 ($p < 0.05$)를 나타내어 두 변수 사이에서 유의 수준 0.05에서 유의한 음의 상관관계를 가지는 것으로 나타났다. 따라서 그레놀의 크기가 커지면 그에 반비례해서 원형율이 감소하고, 크기가 작아지면 반대로 구에 가까운 형태를 나타내는 것으로 판단된다.

3.2. SMA 실험

Acetic acid, Propionic acid 및 Butyric acid를 기질로 사용한 SMA 실험을 통해 각 높이별 그레놀의 비메탄활성도 및 발생 속도를 비교하였다(Fig. 2). Acetic acid를 기질로 하였을 경우 2 m 높이에서 채취한 그레놀이 30.39 mL CH₄/g VSS로 가장 높은 비메탄활성도를 나타내었다. 1M와 3M에서는 초기에 빠른 속도로 메탄가스가 발생하였으나 70 h부터 점차 느리게 소모하였으며 최종적으로 각각 25.49 mL CH₄/g VSS, 22.68 mL CH₄/g VSS로 확인되었다. Propionic acid에

Table 3. ANOVA Test of Size and Roundness along the Height

	Height (m)	Number of granules	Mean size (mm)	Standard deviation (mm)	F-value	p-value
Size	1	1600	0.51 ^a	0.09	98.62	<0.001
	2	1706	0.84 ^b	0.14		
	3	1901	0.90 ^b	0.15		
Roundness	1	1600	0.81 ^c	0.01	42.34	<0.001
	2	1706	0.75 ^b	0.02		
	3	1901	0.72 ^a	0.02		

a,b,c : results of Duncan's multiple range test; different letters indicate significant differences at 95% confidence level.

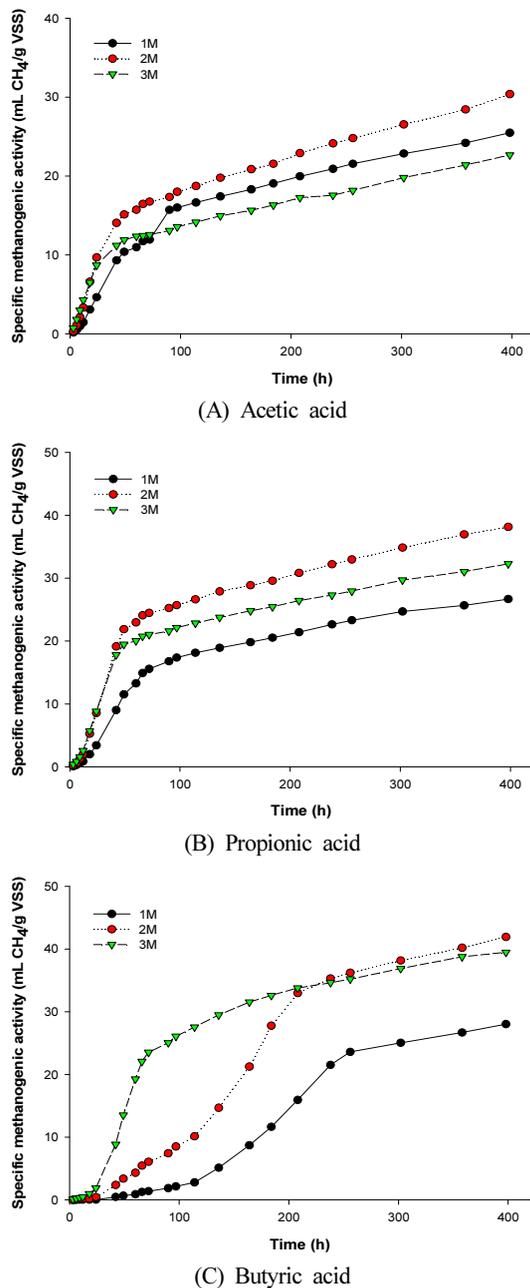


Fig. 2. Monitoring of specific methanogenic activity of anaerobic granules.

Table 4. Summary of Specific Methanogenic Activity (SMA) of Anaerobic Ganules

	1M	2M	3M
	(mL CH ₄ /g VSS)		
Acetic acid	25.49	30.39	22.68
Propionic acid	26.67	38.14	32.26
Butyric acid	28.03	41.94	39.48

서는 모든 시료가 40 h 이전까지 빠른 메탄 생성을 보였지만 이후 발생 속도가 감소하여, 비메탄활성도는 2M, 3M, 1M 순으로 각각 38.14 mL CH₄/g VSS, 31.02 mL CH₄/g VSS, 26.67 mL CH₄/g VSS로 나타났다. Butyric acid의 경우, 3M이 초기에 메탄가스가 빠르게 생성되었지만 230 h 정도 경과 후 2M의 그래놀과 점차 비슷해져 최종적으로 40 mL CH₄/g VSS 정도의 활성도를 보였고 1M은 28 mL CH₄/g VSS의 비교적 낮은 활성도를 나타내었다. 높이에 따른 모든 시료가 Butyric acid, Propionic acid, Acetic acid 순으로 비메탄활성도가 높았고 그중에서도 2 m 높이의 그래놀에서 가장 높게 나타났다(Table 4.). 이는 그래놀을 채취한 실규모 소화조로 주입되는 주정폐수의 구성성분에 의한 것으로 판단되는데, 에탄올 발효과정의 경우 acetic acid의 생산기작과 다르게 NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen)가 NAD⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)로 산화되는 대사경로를 통해 진행되는데, 이때 동일한 대사기작을 이용하는 Propionic acid와 Butyric acid가 주정폐수에 다량 존재하기 때문에, 이미 적응을 거친 메탄 생성균들이 Acetic acid 보다는 Propionic acid와 Butyric acid에 보다 높은 비메탄활성도를 보인 것으로 판단된다.^{16,17)} Glucose를 기질로 하였을 때 혐기성 그래놀의 SMA 결과는 20~30 mL CH₄/g VSS 정도로 보고되어, 상대적으로 보다 메탄생성균이 이용하기 쉬운 유기산을 이용한 본 실험에서 더 높은 비메탄활성도를 보인 것으로 사료된다.¹⁾ 추가적으로 실제 소화조 내에서 높이별 VFA의 성분과 농도 차이가 발생하고 그래놀의 미생물 군집에 따라 유기산을 소비하는 비메탄활성도에도 차이가 나타난 것으로 판단된다.^{18,19)} Acetic acid의 경우 소화조의 하단부인 1M에서 3M보다 메탄 발생량이 많았고 이는 Acetate를 소비하여 메탄과 CO₂를 생성하는 Methanotrix과 같은 Acetoclastic methanogen이 1M에서 우점하며, 2M에서는 수소와 이산화탄소를 소모하여 메탄을 생성하는 Methanobacterium과 같은 Hydrogenotrophic methanogen들이 우점하여 3M에서 적은 비메탄활성도를 보인 것으로 추정된다.²⁰⁾ Methanotrix는 그래놀 생성 과정에서 큰 영향을 미치는 것으로 보고된바 있기 때문에 1m의 그래놀의 경우 기질 유입부와 가까이 위치해 있어 새로 생성되는 그래놀과 같이 비교적 작은 크기의

그래놀들이 분포하고 있고 *Methanotrix*의 우점과 크기에 영향이 있을 것으로 예상된다.²¹⁾ Propionic acid와 Butyric acid의 g VSS당 메탄 발생량에서 1M 보다 3M에서 높은 활성도를 보인 이유는 반응조 특성상 반응조 하부보다 상부의 수소 부분압력이 낮아 3M에서 상대적으로 더 많은 Syntrophic bacteria와 Hydrogentrophic methanogen이 존재하여 효율적인 Propionic acid 및 Butyric acid의 전환이 가능했기 때문으로 판단된다. VSS 대비 메탄 발생량이 가장 많았던 시료는 2M에서 Acetic acid, Propionic acid, Butyric acid를 기질로 하였을 때, 각각 30.39 mL CH₄/g VSS, 38.14 mL CH₄/g VSS, 41.94 mL CH₄/g VSS로 나타났고 추가적인 고세균(Archaea)의 군집 분석을 통해 메탄 발생과의 관계 확인이 필요할 것으로 사료된다.

3.3. EPS Analysis

메탄 생산 그래놀의 생성에 큰 영향을 미치는 EPS는 탄수화물과 단백질 두 가지 성분으로 분류할 수 있다.²²⁾ 탄수화물의 경우, 1M의 그래놀에서 87.56 mg/L로 가장 높았고 단백질의 함량은 2M에서 813.98 mg/L로 가장 높게 측정되었다(Table 5). VSS 대비 탄수화물 성분의 EPS 함량으로 환산하였을 경우, 1M에서 2.61 mg/g VSS로 가장 낮은 값을 보였으며 2M에서 3.12 mg/g VSS로 나타났고 단백질의 함량 역시 비슷한 경향을 보여 2M에서 37.17 mg/g VSS로 확인되었다. EPS의 함량이 높으면 막(Membrane)간의 영양소 이동을 방해할 수 있어 비교적 적은 EPS를 함유하고 있는 혐기성 슬러지의 높은 비메탄 발생량이 보고되기도 하였으나,²³⁾ 본 연구에서는 이와 반대로 EPS 함량이 높을수록 높은 비메탄 발생량을 확인하였다. 이는 상대적으로 높은 EPS 함량이 그래놀의 기질 생물 이용성(Bio-availability)에 긍정적인 영향을 준 것으로 추정된다.²⁴⁾

Table 5. Carbohydrate, Protein and VSS Content in EPS

	Carbohydrate (mg/L)	Protein (mg/L)	VSS (g/L)	mg Carbohydrate /g VSS	mg Protein /g VSS
1M	87.56	615.40	33.6	2.61	18.32
2M	68.33	813.98	21.9	3.12	37.17
3M	73.35	688.13	24	3.06	28.67

4. 결론

본 연구에서는 실제 규모의 UASB 반응조에서 높이별로 채취한 혐기성 그래놀의 물리화학적, 생물학적 특성을 조사하였고 결과는 다음과 같다.

- 1) 그래놀의 크기는 대부분이 0.5 mm 이하로 분포하고 있고 소화조의 상단부인 3M에서 크기가 가장 컸다. 크기가 작은 그래놀들이 더 많이 분포한 1M에서 높은 원형율을 보였으며 크기와 원형율은 음의 상관관계를 나타내었다.
- 2) SMA 실험결과, 모든 기질에서 2M의 비메탄 활성도가 가장 높았다.
- 3) EPS 분석결과, 높이에 따라 함량이 다양하게 나타났으며 2M에서 가장 높았다.

사사

본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 미세플라스틱 측정 및 위해성평가 기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다.(과제번호: RE202101439)

References

1. Cho, S. K., Kim, D. H., Kim, M. H., Shin, H. S. and Oh, S. E., "Enhanced activity of methanogenic granules by low-strength ultrasonication", *Bioresource Technology*, 120, pp. 84-88. (2012).
2. Seghezzi, L., Zeeman, G., van Lier, J. B., Hamelers, H. V. M. and Lettinga, G. "A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors",

- Bioresource Technology, 65(3), pp. 175~190. (1998).
3. Liu, Y., Xu, H. L., Yang, S. F. and Tay, J. H., "Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor", *Water Research*, 37(3), pp. 661~673. (2003).
 4. Del Nery, V., Pozzi, E., Damianovic, M. H., Domingues, M. R. and Zaiat M., "Granules characteristics in the vertical profile of a full-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor treating poultry slaughterhouse wastewater", *Bioresource Technology*, 99(6), pp. 2018~2024. (2008).
 5. Sun, J., Dai, X., Wang, Q., Pan, Y., Ni, B. J., "Modelling Methane Production and Sulfate Reduction in Anaerobic Granular Sludge Reactor with Ethanol as Electron Donor", *Sci Rep.*, 6, p. 35312. (2016).
 6. Makse, H. A., Havlin, S., King, P. R. and Stanley, H. E., "Spontaneous stratification in granular mixtures", *Nature*, 386(6623), p. 379. (1997).
 7. Williams, J. C., "The segregation of particulate materials. A review", *Powder Technology*, 15(2), pp. 245~251. (1976).
 8. Liu, Y., Xu, H. L., Show, K. Y. and Tay, J. H., "Anaerobic granulation technology for wastewater treatment", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, pp. 99~113. (2002).
 9. Koster, I. W. and Cramer, A. "Inhibition of methanogenesis analysis of bacterial morphotypes in microbial communities", *Microbial Ecology*, 41(3), pp. 173~194. (1987).
 10. Herbert, H. P. and Fang, H. L., "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture", *Bioresource Technology*, 82(1), pp. 87~93. (2002).
 11. Bin, Z., Baosheng, S., Min, J., Taishi, G. and Zhenghong, G., "Extraction and analysis of extracellular polymeric substances in membrane fouling in submerged MBR", *Desalination*, 227(1-3), pp. 286~294. (2008).
 12. Cho, S. K., Shin, H. S. and Kim, D. H. "Waste activated sludge hydrolysis during ultrasonication: Two-step disintegration", *Bioresource Technology*, 121, pp. 480~483. (2012).
 13. Liu, J., Dazzo, F. B., Glagoleva, O., Yu, B. and Jain, A. K., "CMEIAS: A Computer-Aided System for the Image Analysis of Bacterial Morphotypes in Microbial Communities", *Microbial ecology*, 41(3), pp. 173~194. (2001)
 14. Shin, S. G., Ahn, Y., Park, C., Choi, Y. K., Cho, H. M. and Cho, S. K., "Size and morphological analysis of ultrasonicated hydrogen-producing granules using a simple method", *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(4), pp. 2246~2252. (2019)
 15. Tay, J.-H. and Yan, Y.-G., "Influence of substrate concentration on microbial selection and granulation during start-up of upflow anaerobic sludge blanket reactors", *Water Environment Research*, 68, pp. 1140~1150. (1996).
 16. Jerald, A., Lalman, S. R. C., Moon, C. M. and Kim, D. H., "Elucidating acetogenic H₂ consumption in dark fermentation using flux balance analysis", *Bioresource Technology*, 146, pp. 775~778. (2013).
 17. Chang, I. S., Kim, J. S., Lee, C. H. and Park, K. S., "A Study on the Inhibition of Anaerobic Digestion for Alcohol Distillery Wastes", *Applied Chemistry for Engineering*, 4(3), pp. 576~582. (1993).
 18. Singh, K. S., Harada, H. and Viraraghavan, T., "Low-strength wastewater treatment by a UASB reactor", *Bioresource Technology*, 55(3), pp. 187~194. (1996).
 19. Massé, D. I., Gilbert, Y., Saady, N. M. C. and Liu, C., "Low-temperature anaerobic digestion of swine manure in a plug-flow reactor", *Environmental Technology*, 34(18), pp. 2617~2624. (2013).
 20. Gorris, L. G. M., van Deursen, J. M. A., van der Drift, C., and Vogels, G. D., "Influence of waste water composition on biofilm development in laboratory methanogenic fluidized bed reactors", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, pp. 95~102. (1988).
 21. Morgan, J. W., Evison, L. M. and Forster, C. F., "The internal architecture of anaerobic sludge granules", *Journal of Chemical Technology &*

- Biotechnology, 50(2), pp. 211~226. (1991).
22. Dignac, M.-F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D. and Scribe, P., "Chemical description of extracellular polymers: Implication on activated sludge floc structure", *Water Science and Technology*, 38(8-9), pp. 45~53. (1998).
23. Mu, Y. and Yu, H.-Q., "Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules", *Biotechnology and bioengineering*, 94, pp. 980~987. (2006).
24. Sheng, G. P., Yu, H. Q. and Li, X. Y., "Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review", *Biotechnology advances*, 28(6), pp. 882~894. (2010).