

## 유기성 폐기물을 이용한 바이오수소 생산

한선기 · 김동훈\* · 신항식\*

한국방송통신대학교 환경보건학과 · \*한국과학기술원 건설 및 환경공학과

### Biohydrogen Production from Organic Waste

Sun-Keel Han · Dong-Hoon Kim\* · Hang-Sik Shin\*

Department of Environmental Health, Korea National Open University

\*Department of Civil and Environmental Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology

#### 1. 서론

인류의 주된 에너지원인 화석연료는 점차 고갈되어가고 있으며 지구온난화의 원인물질인 이산화탄소를 배출시키고 있다. 이러한 배경하에서 수소는 청정 대체에너지원으로서 화석연료의 대안으로 부상하고 있다. 수소는 연소 시 이산화탄소 대신 물을 배출하는 환경친화적인 대체에너지원으로서 기존 연료(hydrocarbon fuels)보다 2.75배나 큰 열량(122 kJ/g)을 가지고 있고, 연료전지(fuel cell)를 통해서 직접 전기를 발생시킬 수 있는 장점을 가지고 있다.<sup>1)</sup>

수소는 전기화학적(electrochemical), 열화학적(thermochemical), 광화학적(photochemical), 광전기화학적(photoelectrochemical) 및 광촉매(photocatalytic)를 이용한 공정 등을 통하여 다양한 방법으로 발생시킬 수 있다.<sup>2)</sup> 그러나, 이러한 공정은 폐기물의 감소 및 에너지의 생산이라는 일석이조의 목적을 달성할 수 없고, 더구나 화석연료의 연소로부터 발생된 전기를 이용하는 단점을 가지고 있다. 따라서 유기성 폐기물로부터 생물학적 방법을 이용한 수소의 생산이 각광을 받고 있다. 생물학적 수소생산에는 광합성 조류(algae)를 이용하여 물을 수소 및 산소로 분해하는 생물학적 광분해(biophotolysis)와 혐기성 발효균을 이용하는 수소 발효(hydrogen fermentation)로 나눌 수가 있는데,<sup>3~6)</sup> 이 중에서도 수소발효는 생물학적 광분해보다 반응속도가 빠르고, 기술적으로 단순하고, 빛이 필요 없을 뿐만 아니라 폐기물로부터 수소를 생산할 수 있는 장점으로 인해 최근 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>7,8)</sup>

수소발효에 대한 그 동안의 연구를 살펴보면, 식종균의 전처리 방법에서부터 기질, 영양분, pH, 온도, H<sub>2</sub> 분압과 같은 다양한 운전인자들에 대해서 광범위한 연구가 이루어졌으며, 또한 반응조 형태에 따른 수소생산의 효율향상도 많이 연구되었다. 하지만 초기에는 주로 인공폐수에 대

한 연구가 많았고, 이어진 연구에서도 액상폐기물에 대한 연구가 대부분이었다. 그러다가 최근에 들어서야 고형폐기물에 대한 연구결과가 보고되고 있다.

따라서 본 논문에서는 유기성 폐기물을 이용한 수소발효 시, 그 기본원리와 여러 가지 운전인자들을 살펴보고, 특히 유기성 고형폐기물에 대한 다양한 운전결과와 향후 가능성을 알아보고자 한다.

#### 2. 수소발효의 원리

기본적인 혐기성 분해경로는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 가수분해, 산생성, 초산생성, 메탄생성으로 이루어진다. 따라서 초산과 H<sub>2</sub>로부터 CH<sub>4</sub>이 생성되는 메탄생성단계를 막을 수 있다면 CH<sub>4</sub> 대신 H<sub>2</sub>를 얻을 수 있다는 것이 수소발효의 기본개념이다.

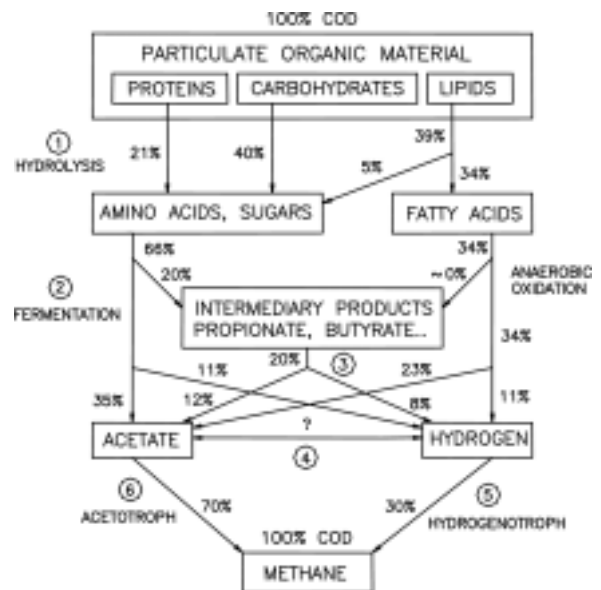


Fig. 1. Anaerobic degradation of polymeric biomass to methane and the microbial groups involved.<sup>9)</sup>

E-mail: skhan003@knu.ac.kr

Tel: 02-3668-4740

Fax: 02-741-4701

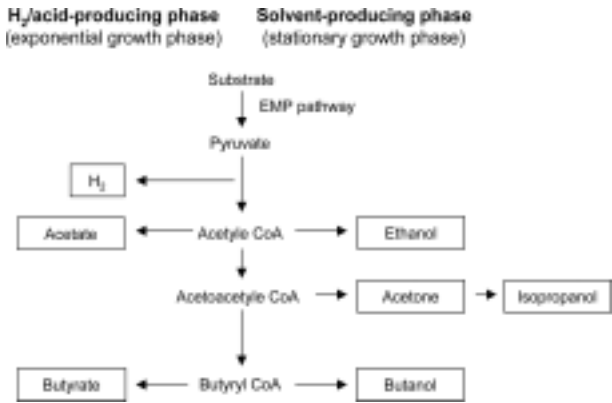
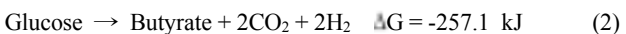
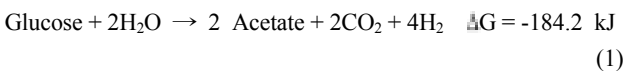


Fig. 2. Metabolic pathway of fermentation by spore-forming bacteria(*Clostridium* sp.).<sup>11)</sup>

따라서 수소생산에 대한 대부분의 연구는 수소소비 메탄균의 활성을 저해시키는 것에 대한 것이었다. 다양한 방법이 시도되었지만 최근에 가장 많이 이용되는 방법은 열처리(heat shock) 방법이다.<sup>1,10)</sup> 이것은 대부분의 미생물은 고온에서 사멸하지만 H<sub>2</sub>를 생성하는 포자생성균은 포자를 통해 살아남는다는 것이다. 수소를 생산하는 대표적 포자생성균으로 *Clostridium* sp.가 있다.

*Clostridium* sp.의 발효 시 대사경로는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 크게 수소/유기산 생성 단계와 용매 생성 단계로 나뉘어진다. *Clostridium* sp.는 대수성장단계에서는 H<sub>2</sub>와 초산, 뷰틸산을 생성하지만, 대수성장단계의 후반이 되면 대사작용의 변경이 일어나 용매를 생산하기 시작해서 정상기에서는 본격적인 용매의 생산이 이루어진다. 따라서 *Clostridium* sp.로 하여금 수소/유기산 생성 단계를 유지하도록 환경조건을 유지시키는 것이 중요하다.

수소발효와 관련된 반응은 식 (1), (2)와 같다.<sup>12)</sup> 반응이 매우 빠르며 빛을 필요로 하지 않고 폐기물 처리에 이용될 수 있는 장점이 있다. 단, 이러한 반응은 H<sub>2</sub>와 같이 발생하는 유기산의 처리가 필요하다는 단점이 있는데, 후단에 메탄발효조를 연결시키는 방법 등으로 해결할 수 있다.



### 3. 수소발효의 운전인자

#### 3.1. 식중균의 전처리

처음에는 2-Bromoethanesulfonate(BES), acetylene, chloroform과 같은 독성물질을 주입함으로써 메탄균을 사멸시켜 수소소비 반응을 막으려는 방법이 시도 되었다.<sup>13,14)</sup> 그러나 화학약품의 비용문제와 낮은 효율로 인해 요즘은 사용되지 않고 있다.

그리고 산/염기 처리법은 수소생성균을 얻는데 효과적인 방법 중 하나이다. 하수슬러지에 대한 산(pH 3)/염기(pH 10)

처리는 수소생산능을 대조구와 비교했을 때 200배와 333배 증가시켰으며,<sup>15)</sup> 산/염기를 이용한 성공적인 연속운전이 보고되었다.<sup>16,17)</sup>

하지만 수소생성균을 얻는 방법으로 가장 많이 사용되고 있는 것은 열처리 방법이다. 열처리는 약 80~100℃에서 10분 이상 가열을 함으로써, 수소를 소비하는 메탄균은 사멸(불활성화)시키고 그 대신 수소를 생산하는 포자형성균(*Clostridium* sp.)만 얻는 방법이다. 또한 열처리는 *Clostridium* sp.의 포자를 발아시키는 효과도 있다.<sup>18)</sup> 그리고 가열온도는 75~121℃까지, 그리고 시간은 10분~12시간까지 다양하게 연구되었다.<sup>12,19~21)</sup> Mu 등에 의하면 열처리는 산/염기 처리보다 더 뛰어난 효과를 보여주는 것으로 보고되었다.<sup>22)</sup>

#### 3.2. 기질

수소발효의 주된 기질은 탄수화물을 포함하는 인공폐수였다. 주로 글루코오스(glucose)와 수크로오스(sucrose)에 대해서 실험이 이루어졌는데, 이들에 대한 각종 운전인자에 대한 연구는 매우 많이 이루어졌다.<sup>23)</sup> 농업폐기물의 주된 성분인 자일로오스(xylose)와 셀룰로오스(cellulose)에 대한 연구도 있었고,<sup>24,25)</sup> 락토오스(lactose)는 고온조건에서 *Clostridium thermolacticum*에게 적절한 기질로 작용하였다.<sup>26)</sup> 또한 다당류인 전분(starch)에 대한 연구도 많이 이루어졌다.<sup>27,28)</sup> 혼합기질인 글루코오스/펩톤(peptone)에 대한 연구도 있었는데, 40% 펩톤과 60% 글루코오스를 함유한 기질에서 최대 수소수율(6.4 mmole-H<sub>2</sub>/g COD)을 보여 주었다.<sup>29)</sup>

그리고 탄수화물이 풍부한 액상폐기물이 기질로서 많이 이용되었는데, 야자유(palm oil) 제조공장 유출수, 식품가공폐수, 화학공장 폐수는 회분식 실험을 통해 각각 최대 수소수율(4.7 L H<sub>2</sub>/L-effluent, 2.8 L H<sub>2</sub>/L-wastewater, 1.25 mmol H<sub>2</sub>/g COD)을 보여주었다.<sup>30~32)</sup> 상향식 반응조를 이용한 곡주(rice winery) 폐수의 수소발효는 다양한 조건에서 운전이 되었는데, HRT 2 h, 유기물부하 34 g COD/L, pH 5.5 및 온도 55℃에서 9.33 L H<sub>2</sub>/g VSS·d의 수소생성속도를 보여주었다.<sup>33)</sup> 설탕폐수를 처리하는 완전혼합형 반응조(CSTR)는 190일 동안 성공적인 거동을 보여주었는데, 2.52 mol H<sub>2</sub>/hexose<sub>consumed</sub>의 높은 수소수율을 기록하였다.<sup>34)</sup> Fan 등은 다양한 HRT 및 pH 조건에서 맥주양조장 폐기물을 처리하는 CSTR을 운전했는데, HRT 18 h 및 pH 5.5에서 최고의 효율(43 mL H<sub>2</sub>/g COD<sub>added</sub>)을 보여주었다.<sup>35)</sup> 또한 유가공 폐수 및 화학 폐수가 연속회분식반응조(SBR)을 이용한 수소생산에 이용되었다.<sup>36,37)</sup>

최근 도시폐기물과 농업폐기물과 같은 고형폐기물에 대한 연구가 많이 보고되고 있는데, 이에 대한 내용은 '4. 고형폐기물의 수소발효'에서 다루기로 한다.

#### 3.3. 영양분

수소발효의 경우 주로 탄수화물을 기질로 많이 이용하지만 그 외에도 N, P, Fe, 미량금속(trace metal) 등이 필요

하다. 그 중에서도 질소는 가장 중요한 것으로서 다양한 형태(암모니아 이온, 효모 추출물, 펩톤 등)로 공급이 되었다. 최적의 C/N비는 연구자에 따라서 다양한데 6.7, 10, 47 등의 값이 보고되었다.<sup>38~40)</sup> 하지만 과도한 암모니아의 첨가는 수소생성의 저해를 가져온다. 암모니아 농도가 0.8에서 7.8 g NH<sub>4</sub>-N/L로 증가되자 수소수율은 1.9에서 1.1 mol H<sub>2</sub>/mol hexose로 감소하였다.

또한 인과 철도 *Clostridium* sp.의 대사경로에 영향을 미쳐 그 양이 부족할 경우, 낙산과 알코올의 생산증가를 가져왔다.<sup>41)</sup> Lin 및 Lay<sup>40)</sup>는 인산염(phosphate)이 탄산염(carbonate)보다 수소생성에 있어 더 나은 버퍼로 작용함을 밝혔고, 인산염의 첨가는 지체기를 감소시키고 수소생산을 1.9배나 증가시켜 주었다.<sup>42)</sup> 한편 철의 효과는 그 동안 많은 연구가 있었다. 이것은 철이 수소화효소(hydrogenase)의 주요성분이기 때문이지만 그 최적농도는 매우 다양한 값이 보고되었다. Lee 등은 FeCl<sub>2</sub> 농도가 각각 4,000 및 800 mg/L일 때 최대 비수소생산속도와 수소수율이 얻어지는 것으로 보고했으며,<sup>43)</sup> Zhang 및 Shen은 온도에 따라 그 최적 값이 달라지는 결과를 얻었다.<sup>44)</sup> 즉, 온도가 25, 35, 40°C로 변화될 때 FeSO<sub>4</sub>의 최적농도는 800, 200, 25 mg/L였다. 그리고 철의 농도가 0에서 200 mg FeSO<sub>4</sub>/L로 증가할 때, 수소수율은 106.4에서 274.0 mL/g starch로 크게 증가했다.<sup>45)</sup>

Lin 및 Lay는 수소발효 시 11가지 미량금속의 효과를 조사했는데, 마그네슘, 나트륨, 아연, 철 등이 중요한 것들이었고 그 중에서도 마그네슘이 가장 중요한 것으로 보고했다.<sup>46)</sup> 수소생산은 최적의 혼합농도(4.8 mg Mg<sup>2+</sup>/L, 393 mg Na<sup>+</sup>/L, 0.25 mg Zn<sup>2+</sup>/L, 1 mg Fe<sup>2+</sup>/L)에서 30% 증가하였다.

### 3.4. pH

pH는 수소화효소의 활성과 *Clostridium* sp.의 대사경로 등에 직접적으로 영향을 끼치기 때문에, 이에 대한 연구는 매우 광범위하게 이루어졌다.<sup>27,47,48)</sup> 그러나 초기 최적 pH와 배양 최적 pH는 4.5에서 9.0에 이르기까지 매우 다양하였다.

약산 pH 범위인 5.0~6.5의 값이 가장 흔히 보고되는 최적 pH 값이다. 오늘날 대부분의 연구자들은 연속운전에 있어서 pH의 값을 5.0~6.0의 범위로 유지한다. Lay 및 Fan은 최적 pH 범위가 5.2~6.0인 결과를 보여주었으며,<sup>27,35)</sup> pH가 4.3보다 낮거나 6.1보다 높은 경우 알코올 생산속도가 수소 생산속도를 초과하였다.<sup>27)</sup> Lin 등에 의하면 초기 최적 pH 6.5에서 최대 수소수율 1.3 mol H<sub>2</sub>/mol xylose를 얻었다(이 때 뷰틸산의 농도는 5,780 mg COD/L, B/A(butyrate/acetate)비의 값은 4.0이었다).<sup>49)</sup> Ferchichi 등은 초기 최적 pH가 6.0인 것으로 보고하였고,<sup>50)</sup> Cheong 및 Hansen은 운전기간 동안 최적 pH 5.7에서 최대의 뷰틸산이 생성됨과 동시에 알코올과 프로피온산의 생성이 억제된다고 보고하였다.<sup>51)</sup> 연속운전에 있어서는 대부분의 연구가

pH 5.5 근처에서 최적의 값이 얻어짐을 보여주고 있다. Fang 및 Liu, Yu 등과 Fan 등은 글루코오스, 곡주 폐수, 맥주양조장 폐기물을 처리함에 있어 모두 최적 pH가 5.5임을 보고하였다.<sup>33,35,48)</sup>

### 3.5. 온도

온도는 미생물의 활성과 발효산물의 전환율, 그리고 경제적인 부분하고도 밀접한 관련이 있다. Zhang 및 Shen은 혼합미생물에 대해서 온도에 대한 민감성이 매우 높으며 최적온도는 약 35°C임을 보여주었다.<sup>44)</sup> Mu 등은 온도를 변화(33~41°C)해 가면서 실험을 하였는데, 온도의 증가에 따라 수소생산과 미생물 성장이 증가하였고 동시에 대사산물의 분포가 변하였다.<sup>52)</sup> 낮은 온도에서는 초산과 에탄올이 주된 액상산물이었다고, 높은 온도에서는 초산과 뷰틸산이 주된 산물이었다. Lee 등은 30~45°C의 범위에서 CIGSB(carrier-induced granular sludge bed) 반응조를 가지고 실험을 하였는데, 40°C에서 최대 수소수율(3.88 mol H<sub>2</sub>/mol sucrose)을 얻었다.<sup>53)</sup> 한편 SRT의 조절을 통해 심지어 15°C에서 만족스러운 수소수율을 얻은 경우도 있었다.<sup>54)</sup>

경제적 부담이 있음에도 불구하고 고온조건(50~60°C)에서 운전한 경우도 있는데, 중온조건(30~40°C)보다 더 나은 결과를 보여주었다. 연속운전에 있어서 Gavala 등 및 Yu 등은 온도를 35°C에서 55°C로 증가시킴으로써 글루코오스와 곡주 폐수에서 향상된 수소생산 결과를 얻었다.<sup>33,55)</sup> Shin 등 및 Valdez-Vazquez 등에 의하면 중온조건보다 고온조건에서 더 높은 수소생산을 기록하였는데, 그것은 미생물 동력학과 물질대사경로가 수소생산에 더 호의적인 쪽으로 변화하였기 때문이다.<sup>56,57)</sup>

연속운전에 있어서 가장 높은 수소수율(2.47 mol H<sub>2</sub>/mol glucose)은 70°C에서 운전된 UASB(upflow anaerobic sludge blanket) 반응조에서 얻어졌으며,<sup>58)</sup> 75°C에서 축산폐기물 슬러리를 처리하는 경우 미생물의 수소소비 활성이 완전히 사라졌다.<sup>59)</sup>

하지만 온도에 대한 효과는 수소생산 측면에서만 아니라 기질분해의 안정성 및 경제적 측면에 이르기까지 광범위한 조사가 필요하다.

### 3.6. HRT

HRT는 수리학적 체류시간으로서 경제성과 직접적으로 관련이 있다. 일반적으로 수소생성균은 짧은 HRT를 선호한다.<sup>60)</sup>

수소발효에 있어서는 단순기질을 이용한 경우, 주로 8~12 h의 HRT가 최적이었다.<sup>61)</sup> 그러나 최근 고정화나 입상화와 같은 최신 기술에 힘입어 훨씬 더 짧은 HRT에서 더 높은 수소생산속도를 얻게 되었다. 캐리어(carrier)로 활성탄을 이용한 고정상 반응기의 경우 HRT 2 h에서 1.32 L/h/L의 수소생산 속도를 기록하였다.<sup>62)</sup> CIGSB 반응조는 심

지어 HRT 0.5 h에서 7.3 L/h/L의 수소생산속도를 얻었다.<sup>63)</sup> 그리고 Wu 등은 가장 높은 수소생산 속도를 보고 하였는데, 실리콘-고정화 슬러지를 이용하여 35.4 g VSS/L의 높은 미생물농도를 유지함으로써 HRT 0.5 h에서 15 L/h/L의 수소생산 속도를 얻었다.<sup>64)</sup>

그러나 고품폐기물을 처리할 경우 가수분해로 인해 최적 HRT는 훨씬 더 길어진다. Shin 및 Youn은 음식물쓰레기로부터 수소를 생산함에 있어 2, 3, 5 d의 체류시간에서 수소생산을 비교하였는데, 5 d에서 최대 수소수율(2.2 mol H<sub>2</sub>/mol hexoseconsumed)을 얻었다.<sup>56)</sup> 가정폐기물로부터는 HRT 2 d에서 43 mL H<sub>2</sub>/g VS의 최대 수소수율을 얻었다.<sup>65)</sup>

### 3.7. H<sub>2</sub> 분압 및 CO<sub>2</sub> 분압

액상에서 H<sub>2</sub> 분압은 수소발효의 핵심인자 중 하나이다. 일반적으로 H<sub>2</sub> 분압이 증가되면 수소화효소의 활성을 감소시키고 수소생산 반응을 열역학적으로 어렵게 만들기 때문에, 수소생산에 있어 부정적인 영향을 갖는 것으로 알려져 있다.<sup>66)</sup> 따라서 H<sub>2</sub> 분압을 감소시키기 위해서 수많은 시도가 있어왔다. 즉, 격렬하게 교반을 한다든지, N<sub>2</sub> 스파징(sparging)을 한다든지, CO<sub>2</sub> 스파징을 한다든지 또는 수소투과성 막(H<sub>2</sub>-permeable membrane)을 이용함으로써 반응액으로부터 용해되어있는 수소를 제거하려는 시도가 있었는데 이러한 방법들은 향상된 수소생산을 가져왔다.<sup>27,67-69)</sup>

CO<sub>2</sub> 분압에 대해서는 소수의 연구만이 보고되었다. 회분식 실험에서는 CO<sub>2</sub>의 감소가 수소생산의 증가를 가져왔지만,<sup>70)</sup> 연속 실험에서는 높은 CO<sub>2</sub> 분압이 수소생산의 증가를 가져왔다.<sup>68)</sup> 높은 CO<sub>2</sub> 분압은 수소분압을 감소시켰을 뿐만 아니라 미생물 동력학을 수소발효에 호의적으로 변화시켰다. N<sub>2</sub> 스파징이 단지 15%의 수소수율 증가를 가져온 것에 반해서 CO<sub>2</sub> 스파징은 수소수율을 거의 2 배 증가시켰다.

### 3.8. 기질농도 및 product inhibition

회분식 실험에서는 pH와 같은 다른 인자에 의해서 많은 영향을 받기 때문에 최적 기질농도의 값이 매우 다양한 값을 보인다. pH가 조절되지 않는 경우, 기질의 농도가 증가할수록 낮은 pH 조건이 되기 때문에, 수소수율은 보통 기질농도의 증가에 따라 감소한다.<sup>71)</sup> Fractional factorial design을 통해서 수소생산에 대한 pH와 기질농도, 그리고 그 둘의 상호작용이 연구되었는데, pH 5.5와 기질농도 7.5 g COD/L에서 최적조건이 얻어졌다.<sup>72)</sup>

연속운전에서 최적의 기질농도를 찾는 것은 보다 의미가 있는데 그것은 실패수를 처리하는데 적용할 수 있기 때문이다. 최고의 결과는 CSTR을 이용한 실험에서 30 g sucrose COD/L의 기질농도로부터 1.09 mol H<sub>2</sub>/mol hexose의 수소수율을 얻은 것이다.<sup>73)</sup> 20 g COD/L 이하인 유입 기질농도에서는 B/A(n-butyrate/acetate) 값의 감소와 수소소비균의 발현으로 수소수율이 감소하였고, 35 g COD/L

이상인 유입기질농도에서는 기질제거율이 감소하였다. 그러나, 기질농도가 10에서 50 g COD/L로 증가했을 때 수소수율이 1.7에서 0.8 mol H<sub>2</sub>/mol hexose로 감소한 경우도 있다.<sup>74)</sup>

높은 기질농도는 보다 효율적인 운전을 가능하게 하지만 product inhibition이 발생할 수 있다. 즉, 수소발효 시대사산물은 특정 농도에서 미생물 활성화와 수소생산에 있어 저해를 가져올 수 있다. 뷰틸산은 유기산 중에서 *Clostridium* sp.에 가장 독성이 있는 것으로 알려져 있는데, 그로 인해 그 저해효과를 감소시키기 위한 많은 연구가 있었고 대부분은 화학적 추출을 이용한 것이었다.<sup>75)</sup> *C. acetobutylicum*의 경우 1.7 g/L의 뷰틸산 농도에서 뷰틸산의 생산을 멈추었고,<sup>76)</sup> 뷰틸산의 독성은 초산보다 더욱 강하여 13 g/L 이상의 뷰틸산은 세포의 성장뿐만 아니라 수소생산에 있어서도 심각한 저해를 가져왔다.<sup>77)</sup> 뷰틸산의 비이온화된 형태는 이온화된 형태보다 더욱 독성이 큰데, Kyazze 등은 안정된 반응조에 뷰틸산을 주입함으로써 비이온화된 뷰틸산의 농도를 33에서 63 mM까지 올렸고, 그 결과 84 h 후에 반응조가 회복되기는 했지만 가스생산이 완전히 멈추는 결과를 보여주었다.<sup>74)</sup>

### 3.9. 반응조 형태

CSTR이 가장 흔하게 이용되는 반응조 형태일지라도 유기물부하와 수소생산속도를 높이기 위해 고농도의 미생물을 함유할 수 있는 여러종류의 반응조들이 도입되었다.

상향류식 반응조는 고농도 곡주 폐수를 처리하여 2 h의 짧은 HRT와 34 g COD/L의 높은 기질농도에서 가장 높은 비수소생산속도(9.33 L H<sub>2</sub>/g VSS·d)를 보여주었다.<sup>33)</sup>

또한 공정의 유연성이 높고 침전조가 필요없는 SBR이 이용되기도 했으나,<sup>78)</sup> Kim 등은 높은 미생물농도와 기질 제거율에도 불구하고 수소생산능에서는 SBR이 CSTR보다 못한 것으로 보고했다.<sup>79)</sup> Arooj 등은 침전슬러지가 비침전슬러지에 비해 낮은 수소생산능력을 갖고 있는 것이 SBR 운전에서 효율이 낮은 이유임을 보여주었다.<sup>80)</sup>

한편 막반응조(MBR)는 HRT 3.3 h에서 수소생산과 미생물농도에서 각각 27% 및 164%의 효율향상을 보여주었다.<sup>81)</sup> 중공사막을 이용한 경우는 HRT 1 h에서 여러 종류의 탄소원(과당, 포도당, 자당)을 분해하는데 안정적인 거동을 보여주었다.<sup>82)</sup> 또한 많은 종류의 고정화 matrix가 고농도의 미생물농도를 유지하기 위해 연구되었는데, 우레탄 폼(urethane foam)과 다공성 유리알이 각각 *Enterobacter aerogens*와 *Clostridium butyricum*에 대해 이용되었다.<sup>83,84)</sup> Chang 등은 다른 종류의 다공성 물질(루파 스펀지(loofah sponge), expanded clay, 활성탄)을 이용하여 고정상 반응조를 운전하였는데, 활성탄을 이용한 경우에서 1.32 L H<sub>2</sub>/L/h의 최고 수소생산속도를 얻었다.<sup>85)</sup> Alginate gel entrapment method를 이용한 유동상 반응조에서는 HRT 2 h에서 0.93 L H<sub>2</sub>/L/h의 높은 수소생산속도를 얻었다.<sup>86)</sup>

그리고 수소를 생산하는 슬러지의 입상화가 성공한 이

후,<sup>87)</sup> UASB 반응조를 이용한 수많은 연구가 이루어졌다. Fang 등은 CSTR을 이용하여 26°C에서 pH 5.5와 HRT 6 h으로 운전을 하였는데, 80일 안에 수소생성 슬러지는 입상화 되었고, 입상슬러지는 직경 1.6 mm와 침강속도 50 m/h를 나타내었다.<sup>87)</sup> Mu 및 Yu는 UASB 반응조를 이용하여 유기물 부하 7.11 g-COD/L/d에 해당하는 HRT 18 h에서 운전을 하여 수소생성 입상슬러지의 여러 가지 물리화학적 특성을 밝혀내었다.<sup>89)</sup> 충분히 입상화된 슬러지는 직경이 1.0~3.5 mm였으며, 밀도는 1.036±0.005 g/mL, 침강속도는 32~75 m/h, 다공성은 0~0.7, 접촉각은 54±2°였다. EPS(extracellular polymeric substances) 분석에서는 단백질보다는 탄수화물이 입상화에 있어 주요역할을 하고 있음을 보여주었다. Lee 등은 입상화를 촉진하기 위해서 바닥에 carrier matrices를 설치한 CIGSB 반응조를 개발하여 HRT 0.5 h에서 7.3 L H<sub>2</sub>/h/L의 최대 수소생산속도를 얻었다.<sup>89)</sup> 유사한 결과로서, Wu 등은 실리콘고정화 및 자체응집 슬러지를 포함하는 반응조를 고안하여, 보고된 값 중 가장 높은 수소생산속도(15 L H<sub>2</sub>/h/L)를 얻었다.<sup>90)</sup> HRT 0.5 h에서 35.4 g VSS/L에 이르는 고농도의 미생물 농도를 유지할 수 있었다. 그러나, 입상화를 위해서 수개월의 시간을 필요로 하는 초기 운전시간(start-up)이 매우 길다는 큰 문제점이 있다. 한편, Zhang 등은 낮은 pH 환경이 세포 표면의 음전하를 감소시켜 세포 사이의 척력을 감소시킨다는 사실에 근거하여, 24 h 동안 슬러지를 산성조건에서 배양시킴으로써 이와 같은 문제를 해결하였다.<sup>91)</sup> 수소생성 입상슬러지는 CSTR에서 114 h 안에 형성되었다.

#### 4. 고품폐기물의 수소발효

##### 4.1. 고품폐기물을 이용한 바이오수소의 생산

유기성 고품폐기물은 수소발효의 좋은 기질이 될 수 있다. 왜냐하면 폐기물의 처리 및 청정 대체에너지의 생산이라는 일석이조의 효과를 얻을 수 있기 때문이다. Lay 등이 처음으로 유기성 고품폐기물의 수소발효 타당성을 조사한 이래,<sup>1)</sup> 많은 종류의 유기성 고품폐기물이 연구되었는데, 그 결과가 Table 1에 정리되어 있다. 유기성 고품폐기물의 종류는 크게 도시고형폐기물과 농업폐기물로 나누어진다.

몇몇 연구는 고품폐기물에 대한 전처리 효과를 잘 나타내 주었는데, 산을 이용한 전처리는 가수분해 효율을 향상시켜 beer less 바이오매스, 옥수수대 폐기물, 밀짚 폐기물을 처리함에 있어 수소생산을 약 10배, 46배 그리고 136배나 증가시켰다.<sup>92~94)</sup> 또한 corn stover 바이오매스를 처리하는데 steam-explosion 공정이 적용되기도 하였다.<sup>95)</sup> Wang 등은 폐수 슬러지로부터 수소를 생산하기 위한 다양한 전처리 방법(초음파, 산처리, 멸균, 결빙/해동, 메탄 생성능 저해 등)을 비교하였는데, 결빙/해동 방법이 가장 효율적이라고 결론지었다.<sup>96)</sup>

**Table 1.** Biohydrogen production from organic solid waste in batch operation

	Substrate	Maximum H <sub>2</sub> yield	Ref.
Municipal solid wastes	Dining hall waste+sludge	180 mL/g VS <sub>added</sub>	[1]
	Rice bran	61 mL/g VS <sub>added</sub>	[104]
	Rice	96 mL/g VS <sub>added</sub>	[105]
	Wastewater sludge	47.0 mL/g COD	[20]
	Food waste+Sewage sludge	1.05 mol H <sub>2</sub> /mol hexose	[98]
	Food waste	1.8 mol H <sub>2</sub> /mol hexose	[56]
	Paper mill waste	-	[57]
Agricultural wastes	Refuse-derived fuels	-	[106]
	Wheat straw wastes	68.1 mL/g VS <sub>added</sub>	[94]
	Beer less biomass	68.6 mL/g VS <sub>added</sub>	[92]
	Olive pulp waste	35.8 mL/g TS <sub>added</sub>	[55]
	Cow waste slurry	29.1 mL/g VS <sub>added</sub>	[59]
	Cornstalk wastes	149.69 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>added</sub>	[93]
	Corn stover biomass	-	[95]

고형폐기물을 처리하는 연속운전은 Table 2에서와 같이 크게 중온 수소발효와 고온 수소발효로 나눌 수 있다. 수소수율은 상대적으로 중온조건 보다는 고온조건에서 더 높았는데, 그 이유는 고온조건에서 반응이 더 빠르고 가수분해 효율이 더 높기 때문이다. 그러나, 고온조건은 많은 에너지를 소모하기 때문에 이로 인한 경제적 문제가 야기될 수 있다.

다수의 연구에서 유기성 폐기물에 있는 비수소생성균의 활성을 억제하기 위해서 기질의 전처리가 필요한 것으로 나타났다. Noike 등은 두부제조 폐기물을 이용한 연속 수소생산은 기질에 있는 젖산균(lactic acid bacteria)으로 인해 불가능했지만, 기질의 열처리(50~90°C, 30분)를 통해 이를 극복하였다.<sup>97)</sup> Kim은 음식물쓰레기를 처리함에 있어 높은 탄수화물 제거율에도 불구하고 수소생산이 감소하는 현상을 관찰했는데, pH 12~13에서 알칼리 처리된 음식물쓰레기를 주입함으로써 이 문제를 해결하였다.<sup>98)</sup> Nam은 알칼리 처리가 유기성 폐기물에 내재하는 비수소생성균의 사멸에 효과적인 방법임을 증명했다.<sup>99)</sup>

**Table 2.** Biohydrogen production from organic solid waste in continuous operation

Reactor temperature	Substrate	HRT	Maximum H <sub>2</sub> yield	Ref.
Mesophilic	Household waste	2 d	43 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>added</sub>	[65]
	Food waste	1.5 d	88.9 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>added</sub>	[98]
	Food waste+ ludge	3 d	62.0 mL/g VS <sub>added</sub>	[99]
	MSW+Slaughter	3 d	33.6 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>added</sub>	[107]
	Food+Paper	50 d	99 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>rem</sub> <sup>a</sup>	[108]
Thermophilic	Food+Paper	21 d	360 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>rem</sub> <sup>a</sup>	[57]
	Food waste	5 d	2.20 mol H <sub>2</sub> /mol hexose	[56]
	Olive pulp waste	1.2 d	7.2 mL H <sub>2</sub> /g TS	[55]
	Garbage slurry+paper	1.2 d	2.4 mol H <sub>2</sub> /hexose	[34]

4.2. 향후 수소발효의 가능성

수소발효를 이용하여 유기성 폐기물을 처리할 경우, 모든 기질이 수소로 전환되는 것이 아니라 약 1/3 정도만 수소로 전환이 되고 나머지는 유기산의 형태로 남기 때문에, 이를 처리할 수 있는 별도의 후속공정이 필요하다. 후속공정으로서 메탄발효(methane fermentation), 광발효(photofermentation), 미생물 연료전지(microbial fuel cell; MFC) 등이 알려져 있다. 자당(sucrose)을 이용한 실험에서 후단에 광발효 공정을 연결함으로써 보다 높은 수소수율을 얻었으며,<sup>100)</sup> 그 중에서도 MFC 공정을 후단에 연결하는 것이 유기물로부터 직접 전기를 얻는다는 측면에서 가장 장래성 있는 공정으로 평가되고 있다. 그러나, 이러한 공정들은 아직 초기단계에 머무르고 있으며 보다 많은 연구가 필요한 실정이다.<sup>18,101)</sup>

따라서 수소발효의 후단공정으로 이용할 수 있는 가장 손쉬운 공정은 이미 수많은 연구가 이루어진 메탄발효 공정을 연결하는 것이다. 전단에서 수소발효를 통해 고부가가치인 청정에너지 수소를 일단 생산하고, 그 이후에 수소발효의 잔류물(유기산)을 메탄으로 전환시키는 것이다. 이것은 기존의 이상소화 공정(산발효+메탄발효)에 대해서 전단공정을 수소발효로 바꾸기만 하면 되기 때문에 기존 공정의 이용측면에서도 매우 효율적이다. Levin 등은 캐나다의 바이오매스 잔류물이 수소와 메탄으로 전환될 경우 얻어지는 에너지를 계산했는데, 이는 캐나다의 연간 에너지사용량의 약 22%에 해당하는 막대한 양이었다.<sup>102)</sup> 또한 Martinez-Perez 등도 UK의 농작물을 수소와 메탄으로 전환할 경우 얻어지는 에너지를 계산했는데, 이는 220만 가구에 전력을 공급할 수 있는 양이었으며 또한 연간 230만톤 이상의 CO<sub>2</sub> 발생을 저감할 수 있었다고 한다.<sup>103)</sup> 액상폐기물 뿐만 아니라 고형폐기물에 대한 ‘수소발효+메탄발효’의 성공적인 운전은 Table 3에 정리되었다.

**Table 3.** Performance of two-stage dark fermentation system (H<sub>2</sub> + CH<sub>4</sub>)

	Substrate	Maximum H <sub>2</sub> yield	Maximum CH <sub>4</sub> yield	Ref.
Waste-water	Sucrose	1.62 mol H <sub>2</sub> /mol hexose <sub>added</sub>	323 mL CH <sub>4</sub> /g COD <sub>added</sub>	[109]
	Sweet sorghum extract	10.4 L H <sub>2</sub> /kg substrate	29 L CH <sub>4</sub> /kg substrate	[110]
Solid wastes	Carbohydrate-rich food waste	310 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>added</sub>	210 mL CH <sub>4</sub> /g VS <sub>added</sub>	[12]
	Food waste	2.2 mol H <sub>2</sub> /mol hexose <sub>consumed</sub>	240 mL CH <sub>4</sub> /g VS	[56]
	Olive pulp waste	35.8 mL/g TS <sub>added</sub>	425.6 mL/g TS <sub>added</sub>	[55]
	MSW + Slaughterhouse waste	33.6 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>added</sub>	Not available	[107]
	Household solid waste	43 mL H <sub>2</sub> /g VS <sub>added</sub>	500 mL CH <sub>4</sub> /g VS <sub>added</sub>	[65]
	Garbage slurry + paper	2.4 mol H <sub>2</sub> /hexose	Not available	[111]

5. 결론

수소발효의 기본개념은 혐기성 분해경로의 메탄생성단계를 차단함으로써 CH<sub>4</sub> 대신 H<sub>2</sub>를 얻는 것으로, 수소소비 메탄균의 활성을 저해시키기 위해 열처리 방법(80~100℃에서 10분 이상 가열)이 많이 이용되고 있다. 그리고 기질은 탄수화물을 포함하는 인공폐수, 액상폐기물, 고형폐기물의 순서로 이용되어 왔으며, 탄수화물 이외에도 N, P, Fe, 미량금속 등의 영양물질이 필요했다. pH는 5.0~6.0의 값이 최적이었으며, 온도는 약 35℃가 최적이었다. HRT는 단순기질을 이용한 경우 8~12 h이 최적이었다. 그러나 최근 고정화나 입상화와 같은 최신 기술에 힘입어 훨씬 더 짧은 HRT에서 더 높은 수소생산속도를 얻게 되었다. 일반적으로 H<sub>2</sub> 분압의 증가가 수소생산에 부정적인 영향을 갖기 때문에 H<sub>2</sub> 분압을 감소시키기 위해서 수많은 시도가 있어왔다. 연속운전에서 최적 기질농도에 대한 최고의 결과는 CSTR을 이용한 실험에서 30 g sucrose COD/L의 기질농도로부터 1.09 mol H<sub>2</sub>/mol hexose의 수소수율을 얻은 것이었다. CSTR이 가장 흔하게 이용되지만 고농도의 미생물을 함유할 수 있는 여러 종류의 반응조들이 도입되었다. 그리고 수소생성균의 입상화가 성공한 이후 UASB 반응조를 이용한 수많은 연구가 이루어졌다. 특히, 유기성 고형폐기물의 수소발효는 기질의 전처리가 필요한 것으로 나타났으며, 증온조건보다 고온조건에서 수소수율이 더 높았는데 에너지 소모로 인한 경제적인 문제가 검토되어야 한다. 그리고 수소발효는 잔류물로 유기산이 남기 때문에 이를 처리할 수 있는 별도의 후속공정이 필요하며 여기에 이용할 수 있는 가장 손쉬운 공정은 이미 많은 연구가 이루어진 메탄발효 공정이다.

참고 문헌

- Lay, J. J., Lee, Y. J., and Noike, T., "Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste," *Water Res.*, **33**, 2579~2586 (1999).
- Momirlan, M. and Veziroglu, T., "Current status of hydrogen energy," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **6**, 141~179(2002).
- Kumar, A., Jain, S. R., Sharma, C. B., Joshi, A. P., and Kalia, V. C., "Increased H<sub>2</sub> production by immobilized microorganisms," *Appl. J Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 156~159(1995).
- Kataoka, N., Miya, A., and Kiriya, K., "Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen producing anaerobic bacteria," *Water Sci. Technol.*, **36**, 41~47(1997).
- Fascetti, E. and Todini, O., "Rhodobacter sphaeroides RV cultivation and hydrogen production in a one- and two-stage chemostat," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 300~

- 305(1995).
6. Markov, T., Miura, Y., Fukatsu, K., Miyasaka, H., Ikuta, Y., Matsumoto, H., Hamasaki, A., Shioji, N., Mizoguchi, T., Yagi, K., and Maeda, I., "Hydrogen production by photosynthetic microorganisms," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63-65**, 577~584(1997).
  7. Benemann, J., "Hydrogen biotechnology: progress and prospects," *Nature Biotechnol.*, **14**, 1101~1103(1996).
  8. Nandi, R. and Sengupta, S., "Microbial production of hydrogen: an overview," *Critical Reviews in Microbiology*, **24**, 61~84(1998).
  9. Gujer, W. and Zender, A. J. B., "Conversion process in anaerobic digestion," *Water Sci. Technol.*, **15**, 127~167 (1983).
  10. Lay, J. J., "Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen," *Biotechnol Bioeng.*, **68**, 269~278(2000).
  11. Yan, R. T., Zhu, C. X., Golembosik C., Chen J. S., "Expression of solvent-forming enzymes and onset of solvent production in batch culture of *Clostridium butyricum*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 642~648(1988).
  12. Han, S. K. and Shin, H. S., "Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**(6), 569~577(2004).
  13. Sparling, R., Risbey, D., and Poggi-Varaldo, H. M., "Hydrogen production from inhibited anaerobic composters," *Int. J. Hydrogen Energy*, **22**(6), 563~566(1997).
  14. Liang, T. M., Cheng, S. S., and Wu, K. L., "Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane," *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1157~1165(2002).
  15. Chen, C. C., Lin, C. Y., and Lin, M. C., "Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 224~228(2002).
  16. Lin, C. Y. and Chou, C. H., "Anaerobic hydrogen production from sucrose using an acid-enriched sewage sludge microflora," *Life. Sci.*, **4**(1), 66~70(2004).
  17. Lin, C. Y., Hung, C. H., Chen, C. H., Chung, W. T., and Cheng, L. H., "Effects of initial pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures," *Process Biochem.*, **41**, 1383~1390(2006).
  18. Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., and Hawkes, D. L., "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress," *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**(2), 172~184(2007).
  19. Chang, J. S., Lee, K. S., and Lin, P. J., "Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors," *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**(11/12), 1167~1174(2002).
  20. Wang, C. C., Chang, C. W., Chu, C. P., Lee, D. J., Chang, B. V., Liao, C. S., and Tay, J. H., "Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*," *J. Biotechnol.*, **102**, 83~92(2003).
  21. Fan, K. S. and Chen, Y. Y., "H<sub>2</sub> production through anaerobic mixed culture: effect of batch S0/X0 and shock loading in CSTR," *Chemosphere*, **57**, 1059~1068(2004).
  22. Mu, Y., Yu, H. Q., and Wang, G., "Evaluation of three methods for enriching H<sub>2</sub>-producing cultures from anaerobic sludge," *Enzyme Microb. Technol.*, **40**(4), 947~953 (2007).
  23. Li, C. and Fang, H. H. P., "Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures," *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1~39(2007).
  24. Lin, C. Y. and Cheng, C. H., "Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**(7), 832~840(2006).
  25. Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., and Sparling, R., "Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates," *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**(11), 1496~1503(2006).
  26. Collet, C., Adler, N., Schwitzguebel, J.-P., and Peringer, P., "Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 1479~1485(2004).
  27. Lay, J. J., "Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen," *Biotechnol. Bioeng.*, **68**(3), (2000).
  28. Liu, G. and Shen, J., "Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria," *J. Biosci. Bioeng.*, **98**(4), 251~256 (2004).
  29. Bai, M. D., Cheng, S. S., and Chao, Y. C., "Effects of substrate components on hydrogen fermentation of multiple substrates," *Water Sci. Technol.*, **50**(8), 209~216(2004).
  30. Atif, A. A. Y., Fakhru'l- Razi, A., Ngan, M. A., Morimoto, M., Iyuke, S. E., and Veziroglu, N. T., "Fed batch production of hydrogen from palm oil mill effluent using anaerobic microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **30**(13-14), 1393~1397(2005).
  31. Ginkel, S. V., Oh, S. E., and Logan, S. E., "Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters," *Int. J. Hydrogen Energy*, **30**(15), 1535~1542(2005).
  32. Mohan, S. V., Babu, V. L., and Sarma, P. N., "Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia," *Water Res.*, **41**(12), 2652~2664(2007).
  33. Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., and Zhang, H., "Hydrogen production from rice winery wastewater in an upflow anaerobic reactor using mixed anaerobic cultures," *Int. J.*

- Hydrogen Energy*, **27**, 1359~1365(2002).
34. Ueno, Y., Otsuka, S., and Morimoto, M., "Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture," *J. Ferment. Bioeng.*, **82**(2), 194~197(1996).
  35. Fan, K. S., Kan, N. R., and Lay, J. J., "Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR," *Bio-resour. Technol.*, **97**, 84~89(2006).
  36. Mohan, S. V., Babu, V. L., and Sarma, P. N., "Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor(AnSBR): Effect of organic loading rate," *Enzyme. Microb. Technol.*, **41**, 506~515 (2007).
  37. Mohan, S. V., Babu, V. L., and Sarma, P. N., "Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia," *Water Res.*, **41**(12), 2652~2664(2007).
  38. Liu, G. and Shen, J., "Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria," *J. Biosci. Bioeng.*, **98**(4), 251~256(2004).
  39. Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A. A. Y., Ngan, M. A., Fakhru'l-Razi, A., Iyuke, S. E., and Bakir, A. M., "Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **19**, 709~713(2004).
  40. Lin, C. Y. and Lay, C. H., "Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**(1), 41~45(2004).
  41. Bahl, H. and Durre, P., "Clostridia: Biotechnology and medical applications," Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 57~63(2001).
  42. Lin, C. Y. and Lay, C. H., "Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 275~281(2004).
  43. Lee, Y. J., Miyahara, T., and Noike, T., "Effect of iron concentration on hydrogen fermentation," *Bioresour. Technol.*, **80**, 227~231(2001).
  44. Zhang, Y. and Shen, J., "Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 441~446(2006).
  45. Yang, H. and Shen, J., "Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch," *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**(4), 441~446 (2006).
  46. Lin, C. Y. and Lay, C. H., "A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **30**, 285~292(2005).
  47. Dabrock, B., Bahl, H., and Gottschalk, "Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(4), 1233~1239(1992).
  48. Fang, H. H. P. and Liu, H., "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture," *Bio-resour. Technol.*, **82**(2), 87~93(2002).
  49. Lin, C. Y., Hung, C. H., Chen, C. H., Chung, W. T., and Cheng, L. H., "Effects of initial pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures," *Process Biochem.*, **41**, 1383~1390(2006).
  50. Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G. H., Hintz, W., and Almadidy, A., "Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey," *J. Biotechnol.*, **120**, 402~409(2005).
  51. Cheong, D. Y. and Hansen, C. L., "Acidogenic characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen," *Process Biochem.*, **41**, 1736~1745(2006).
  52. Mu, Y., Wang, G., and Yu, H. Q., "Kinetic modeling of hydrogen production process by mixed anaerobic cultures," *Bioresour. Technol.*, **97**(11), 1302~1307(2006).
  53. Lee, K. S., Lin, P. J., and Chang, J. S., "Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers," *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 465~472(2006).
  54. Lin, C. Y. and Chang, R. C., "Fermentative hydrogen production at ambient temperature," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 715~720(2004).
  55. Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Ahring, B. K., and Lyberatos, G., "Thermophilic anaerobic fermentation of olive pulp for hydrogen and methane production: modelling of the anaerobic digestion process," *Water Sci. Technol.*, **53**(8), 271~279(2006).
  56. Shin, H. S. and Youn, J. H., "Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis," *Biodegradation*, **16**, 33~44(2005).
  57. Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garcia, F., Cecchi, F., and Poggi-Valardo, H. M., "Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: Mesophilic versus thermophilic regime," *Int. J. Hydrogen Energy*, **30**(13/14), 1383~1391(2005).
  58. Kotsopoulos, T. A., Zeng, R. J., and Angelidaki, I., "Biohydrogen production in granular up-flow anaerobic sludge blanket(UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature(70°C)," *Biotechnol. Bioeng.*, **94**(2), 296~301(2006).
  59. Yokoyama, H., Waki, M., Moriya, N., Yasuda, T., Tanaka, Y., and Haga, K., "Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by



- using anaerobic microflora within the slurry,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**(2), 474~483(2007).
60. Jones, D. T. and Woods, D. R., “Acetone-butanol fermentation revisited,” *Microbiol. Rev.*, **50**(4), 484~524 (1986).
  61. Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., and Hussy, I., “Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1339~1347(2002).
  62. Chang, J. S., Lee, K. S., and Lin P. J., “Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**(11/12), 1167~1174(2002).
  63. Lee, K. S., Wu, J. F., Lo, Y. S., Lo, Y. C., Lin, J., and Chang, J. S., “Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor,” *Biotechnol. Bioeng.*, **87**(5), 648~657(2004).
  64. Wu, S. Y., Hung, C. H., Lin, C. N., Chen, H. W., Lee, A. S., and Chang, J. S., “Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge,” *Biotechnol. Bioeng.*, **93**(5), 934~946(2005).
  65. Liu, D., Liu, D., Zeng, R. J., and Angelidaki, I., “Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process,” *Water Res.*, **40**, 2230~2236(2006).
  66. Bahl, H. and Dürre, P., “Clostridia: Biotechnology and medical applications,” Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 57~63(2001).
  67. Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., and Noike, T., “Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging,” *Bioresour. Technol.*, **73**(1), 59~65(2000).
  68. Kim, D. H., Han, S. K., Kim, S. H., and Shin, H. S., “Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 2158~5169(2006).
  69. Liang, T. M., Cheng, S. S., and Wu, K. L., “Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1157~1165(2002).
  70. Park, W., Hyun, S. H., Oh, S. E., Logan, B. E., and Kim, I. S., “Removal of headspace CO<sub>2</sub> increases biological hydrogen production,” *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 4416~4420(2005).
  71. Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., and Sparling, R., “Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**(11), 1496~1503(2006).
  72. Ginkel, S. V., Lay, J. J., and Sung, S., “Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration,” *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 4726~4730(2001).
  73. Kim, S. H., Han, S. K., and Shin, H. S., “Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter,” *Process Biochem.*, **41**, 199~207 (2006).
  74. Kyazze, G., Martinez-Perez, N., Dinsdale, R., Premier, G. C., Hawkes, F. R., Guwy, A. J., and Hawkes, D. L., “Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production,” *Biotechnol. Bioeng.*, **93**(5), 971~979(2005).
  75. Zigova, J., Sturdik, E., Vandak, D., and Schlosser, S., “Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction,” *Process Biochem.*, **34**, 835~843(1999).
  76. Martin, J. R., Petitdemange, H., Ballongue, J., and Gay, R., “Effects of acetic and butyric acids on solvents production by *Clostridium acetobutylicum*,” *Biotechnol. Lett.*, **5**, 469~474(1983).
  77. Chin, H. L., Chen, Z. S., and Chou, C. P., “Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production,” *Biotechnol. Prog.*, **19**, 383~388(2003).
  78. Lin, C. and Jo, C., “Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 678~684(2003).
  79. Kim, S. H., Han, S. K., and Shin, H. S., “Performance comparison of a continuous-flow stirred-tank reactor and an anaerobic sequencing batch reactor for fermentative hydrogen production depending on substrate concentration,” *Water Sci. Technol.*, **52**(10-11), 23~29(2005).
  80. Arooj, M. F., Han, S. K., Kim, S. H., Kim, D. H., and Shin, H. S., “Sludge characteristics in anaerobic SBR system producing hydrogen gas,” *Water Res.*, **41**, 1177~1184(2007).
  81. Oh, S. E., Iyer, P., Bruns, M. A., and Logan, B., “Biological hydrogen production using a membrane bioreactor,” *Biotechnol. Bioeng.*, **87**(1), 119~127(2004).
  82. Lee, K. S., Lin, P. J., Fangchiang, K., and Chang, J. S., “Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**(8), 950~957 (2007).
  83. Tanisho, S. and Ishiwata, I., “Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **20**(7), 541~545(1995).
  84. Yokoi, H., Maeda, Y., Hirose, J., Hayashi, S., and Takasaki, Y., “H<sub>2</sub> production by immobilized cells of *Clo-*

- stridium butyricum* on porous glass beads,” *Biotechnol. Tech.*, **11**(6), 431~433(1997).
85. Chang, J. S., Lee, K. S., and Lin P. J., “Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**(11/12), 1167~1174(2002).
  86. Wu, S. Y., Lin, C. N., and Chang, J. S., “Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors,” *Biotechnol. Prog.*, **19**, 828~832(2003).
  87. Fang, H. H. P., Liu, H., and Zhang, T., “Characterization of a hydrogen-producing granular sludge,” *Biotechnol. Bioeng.*, **78**(1), 44~52(2002).
  88. Mu, Y. and Yu, H. Q., “Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules,” *Biotechnol. Bioeng.*, **94**(5), 980~987(2006).
  89. Lee, K. S., Wu, J. F., Lo, Y. S., Lo, Y. C., Lin, J., and Chang, J. S., “Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor,” *Biotechnol. Bioeng.*, **87**(5), 648~657(2004).
  90. Wu, S. Y., Hung, C. H., Lin, C. N., Chen, H. W., Lee, A. S., and Chang, J. S., “Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge,” *Biotechnol. Bioeng.*, **93**(5), 934~946(2005).
  91. Zhang, Y. and Shen, J., “Enhancement effect of gold nanoparticles on biohydrogen production from artificial wastewater,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**(1), 17~23(2007).
  92. Fan, Y. T., Zhang, G. S., Guo, X. Y., Xing, Y., and Fan, M. H., “Biohydrogen-production from beer less biomass by cow dung compost,” *Biomass Bioenergy*, **30**(5), 493~496(2006).
  93. Zhang, M. L., Fan, Y. T., Xing, Y., Pan, C. M., Zhang, G. S., and Lay, J. J., “Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures,” *Biomass Bioenergy*, **31**(4), 250~254(2007).
  94. Fan, Y. T., Zhang, Y. H., Zhang, S. F., Hou, H. W., Ren, B. Z., “Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost,” *Bioresour. Technol.*, **97**(3), 500~505(2006).
  95. Datar, R., Huang, J. H., Maness, P. C., Mohagheghi, A., Czernik, S., and Chornet, E., “Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**(8), 932~939(2007).
  96. Wang, C. C., Chang, C. W., Chu, C. P., Lee, D. J., Chang, B. V., Liao, C. S., and Tay, J. H., “Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*,” *J. Biotechnol.*, **102**, 83~92(2003).
  97. Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., and Ohba, M., “Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1367~1371(2002).
  98. Kim, S. H., “Continuous biohydrogen production by mesophilic anaerobic fermentation of organic solid waste,” Doctoral thesis, Dept. Civil and Environ. Eng. KAIST(2005).
  99. Nam, J. Y., “Continuous biohydrogen production by co-digestion of alkali-treated food waste and sewage sludge,” Master's thesis, Dept. Civil and Environ. Eng. KAIST(2006).
  100. Tao, Y., Chen, Y., Wu, Y., He, Y., and Zhou, Z., “High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**(2), 200~206(2007).
  101. Li, C. and Fang, H. H. P., “Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures,” *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1~39(2007).
  102. Levin, D. B., Zhu, H., Beland, M., Cicek, N., and Holbein, B. E., “Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada,” *Bioresour. Technol.*, **98**, 654~660(2007).
  103. Martinez-Perez, N., Cherryman, S. J., Premier, G. C., Dinsdale, R. M., Hawkes, D. L., Hawkes, F. R., Kyazze, G., and Guwy, A. J., “The potential for hydrogen-enriched biogas production from crops: Scenarios in the UK,” *Biomass Bioenerg.*, **31**(2-3), 95~104(2007).
  104. Noike, T. and Mizuno, O., “Hydrogen fermentation of organic municipal wastes,” *Water Sci. Technol.*, **42**(12), 155~162(1999).
  105. Okamoto, M., Miyahara, T., Mizuno, O., and Noike, T., “Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes,” *Water Sci. Technol.*, **41**(3), 25~32(2000).
  106. Sakka, M., Kimura, T., and Sakka, K., “Comparison of microbial consortia in refuse-derived fuel(RDF) preparations between Japan and Germany,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**(12), 2868~2873(2006).
  107. Gomez, X., Moran, A., Cuertos, M. J., and Sanchez, M. E., “The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process,” *J. Power Sources*, **157**, 727~732(2006).
  108. Alzate-Gaviria, L. M., Sebastian, P. J., Perez-Hernandez, A., and Eapen, D., “Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater,” *Int. J. Hydrogen Energy*, **32**(15), 3141~3146(2007).

109. Kyazze, G., Dinsdale, R., Guwy, A. J., Hawkes, F. R., Premier, G. C., and Hawkes, D. L., "Performance characteristics of a two stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously," *Biotechnol. Bioeng.*, **97**(4), 759~770(2007).
110. Antonopoulou, G., Gavala, H. L., Skiadas, I. V., Angelopoulos, K., and Lyberatos, G., "Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentation hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass," *Biore-sour. Technol.*, **99**(1), 110~119(2008).
111. Ueno, Y., Fukui, H., and Goto, M., "Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste," *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 1413~1419(2007).