

## 미세조류를 이용한 중온 및 고온 혐기성 수소 발효

한선기<sup>1</sup> · 최재민<sup>2</sup> · 이채영<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>한국방송통신대학교 환경보건학과, <sup>2</sup>수원대학교 토목공학과·하천환경기술연구소

### Hydrogen Production from Microalgae in Anaerobic Mesophilic and Thermophilic Conditions

SUN-KEE HAN<sup>1</sup>, JAE-MIN CHOI<sup>2</sup>, CHAE-YOUNG LEE<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Environ. Health, Korea National Open University, 86, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Civil Eng., The University of Suwon, 17, Wauan-gil, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea  
Institute River Environmental Technology, 17, Wauan-gil, Gyeonggi-do, Korea

**Abstract** >> This study was conducted to evaluate the characteristics of dark fermentative H<sub>2</sub> production from microalgae (*Chlorella vulgaris*) using batch reactors under mesophilic (25, 35°C) and thermophilic (45, 55°C) conditions. The H<sub>2</sub> yield and H<sub>2</sub> production rate increased with increasing temperature. The maximum H<sub>2</sub> yield and H<sub>2</sub> production rate were 56.77 mL H<sub>2</sub>/g dcw, 3.33 mL H<sub>2</sub>/g dcw·h at 55°C, respectively. The activation energy calculated using Arrhenius equation was 36.24 kcal/mol, which was higher than that of dark H<sub>2</sub> fermentation of glucose by anaerobic mixed culture. Although the concentration of butyrate was maintained, the concentrations of lactate and acetate increased with increasing temperature. The H<sub>2</sub> yield was linearly proportional to acetate/butyrate ratio.

**Key words** : Mesophilic(중온), Theromophilic(고온), Microalgae(미세조류), Dark H<sub>2</sub> fermentation(혐기성 수소 발효), Volatile fatty acids(휘발성 지방산)

## 1. 서 론

경제가 성장함에 따라 에너지 수요는 지속적으로 증가하고 있다. 화석연료는 연소 시 부산물에 의한 온실효과 등의 환경적 문제, 유가 상승 등의 사회경제적인 문제를 유발한다<sup>1,2)</sup>. 이러한 문제를 해결하는 방안으로 환경에 미치는 영향이 적으며 재생가능한 에너지 매체인 수소의 관심과 수요가 증가하고 있다<sup>1,2)</sup>.

이에 따라 에너지 매체로서의 수소는 경제적인 생산 방법 및 활용 방안 등이 요구되고 있다<sup>2)</sup>.

생물학적으로 수소를 생산하는 방법은 크게 광합성(photosynthetic) 미생물에 의한 수소 생산 방법과 빛 에너지가 필요 없는 혐기성 발효로 구분할 수 있다<sup>3,4)</sup>. 광합성 미생물을 이용한 수소 생산은 효율이 낮으며 빛이 없을 경우 운영되지 못하는 단점을 가지고 있다. 반면 혐기성 수소 발효는 빛 에너지를 필요로 하지 않으며 다양한 유기성 폐자원을 기질로 이용할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 혐기성 수소 발효는 광합성 미생물을 이용한 수소 생산 방법에

† Corresponding author : chaeyoung@suwon.ac.kr

[ 접수일 : 2014.07.25 수정일 : 2014.08.04 게재확정일 : 2014.08.31 ]

Copyright © 2014 KHNES

비해 안정적이며 저비용의 운전이 가능하다<sup>3,5</sup>).

혐기성 발효를 통한 수소 생산 시 배양 온도, 기질 종류 및 농도는 주요 운전 인자들이다. 배양 온도는 수소 생성 미생물의 활성도에 영향을 미치는 주요 인자 중 하나이다. 그러나 선행 연구들에 의하면 상이한 결과를 나타내는 결과들이 보고되고 있다. Wang과 Wan (2008)은 포도당(glucose)를 기질로 이용하였으며 배양 온도는 20-55°C로 제어하였다. 그 결과에 따르면 증온 소화(35°C) 시 고온(55°C)에 비해 수소 발생 속도가 3.8배 높게 나타났다<sup>6</sup>). 그러나 Nazlina 등(2009)에 따르면 음식물을 기질로 이용할 경우 온도가 상승함에 따라 수소 전환율이 높아진 것으로 보고되었다<sup>7</sup>). 또한, Koskinene 등(2008)에 따르면 온천수를 이용한 수소 발효 시 최적의 배양 온도(37-70°C)는 45°C로 보고되었다. 이렇듯 배양 온도는 기질의 종류에 따라 적정 조건에 상이한 것으로 나타났다<sup>8</sup>).

신·재생에너지 기술이 발전함에 따라 이러한 에너지를 생산할 수 있는 새로운 에너지원에 대한 관심 역시 증가되고 있다. 제 1, 2 세대인 에너지 곡물과 유기성 폐자원을 거쳐 제 3세대 에너지원인 조류계 바이오매스가 최근 주목받고 있다. 조류는 식물과 달리 물리적 형태로는 구분이 불분명하며 현재 약 300,000종 이상이 지구상에 분포되어 있다<sup>9</sup>).

미세조류의 경우 환경조건, 종의 차이 등에 따라 상이할 수는 있으나 여러 층의 두꺼운 세포벽을 가지고 있다. 또한 세포벽 내에는 algaenan이라는 조류 섬유소가 존재하여 분해에 대한 저항성이 있다<sup>5</sup>). 따라서 미세조류를 이용한 에너지 생산 시 적정의 배양 조건 및 전처리가 필요하다. 조류를 이용한 수소 발효 시 전처리에 관한 연구는 많은 결과들이 발표되었다. Jung 등(2011)는 *Laminaria Japonica*를 기질로 이용하였으며 열적 전처리를 통해 109.6 mL H<sub>2</sub>/g COD<sub>added</sub>의 수소 전환율을 얻었다<sup>10</sup>). 또한, 최재민(2013)은 *Chlorella vulgaris*를 기질로 이용하였다. 산-열 병합처리의 최적 조건은 반응표면분석법을 통해 도출

하였으며 48.4mL H<sub>2</sub>/g dry cell weight(dcw)의 수소 전환율을 나타내었다<sup>5</sup>). 그러나 조류를 이용한 수소 발효 시 적정 배양 온도에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 선행 문헌 조사를 통해 적정의 전처리 조건으로 수행된 미세조류를 기질로 이용하였으며 배양 온도에 따른 수소 발생 특성에 대해 파악하고자 한다. 또한 총 휘발성 유기산(total volatile fatty acids)분석을 통해 배양 온도에 따른 수소 발생 시 부산물의 거동을 파악하고자 한다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 식종 미생물 및 기질

#### 2.1.1 식종 미생물

식종 미생물은 S시에 위치한 하수처리장 혐기성 증온 소화조에서 유출되는 소화슬러지를 사용하였다. 휘발성 고형물(volatil solids, VS), pH와 알칼리도는 각각 18.4g/L, 6.8 및 2.2g/L as CaCO<sub>3</sub>로 나타났다. 채수한 소화슬러지는 식종 미생물로 이용하기 위해 10mm 체를 이용하여 불순물을 제거하였다. 또한, 수소 전환율을 증가시키고 수소 소비 미생물 및 수소와 무관한 미생물의 성장을 억제하기 위해 90°C에서 20분간 열처리를 수행 후 사용하였다.

#### 2.1.2 기질

본 연구에서 사용된 기질은 *C. vulgaris*를 이용하였다. *C. vulgaris*는 당을 기질로 이용하였으며 탱크에서 배양된 것을 이용하였다. 탱크에서 회수된 *C. vulgaris*는 가열 증발하여 분말형태로 실험 전까지 변형을 방지하기 위해 4°C, 암실에서 보관하였다. 기질의 총 화학적 산소 요구량(total chemical oxygen demand, TCOD)은 1.5g COD/g dcw로 나타났다. 탄수화물, 단백질과 지방의 구성 비율은 각각 42.5, 56.7 및 0.8%로 나타났다.

## 2.2 실험장치 및 운전조건

회분식 암발효 반응조는 유효체적이 300mL이며 아크릴 재질로 제작하였다. 반응조 상단에서는 바이오 가스 발생량, 가스 조성 분석 및 pH 측정이 가능하도록 제작하였다. 식중은 반응조의 30%를 식중 미생물로 채웠으며 나머지 부분은 76g dcw/L의 *C. vulgaris*로 채웠다. 식중 미생물과 기질로 채워진 반응조는 질소 가스를 이용하여 혐기 조건으로 전환하였다.

배양 온도는 열순환 펌프가 장착된 온탕기를 이용하여 각각 25, 35, 45 및 55°C로 유지하였다. 교반 강도는 150rpm으로 고정하였으며 pH는 *C. vulgaris* 분해 시 알칼리도 구성물질이 분출되어 별도의 제어를 수행하지 않았다<sup>11)</sup>.

## 2.3 분석 및 해석 방법

바이오 가스 발생량은 체적 측정이 가능한 유리 주사기를 이용하였으며 반응조 상단의 가스 배출구를 이용하였다. 수소 가스의 함량은 gas-tight syringe를 이용하여 0.2mL를 채취한 후 열전도검출기(thermal conductivity detector, TCD)가 장착된 가스 크로마토그래피(gas chromatography, Gow Mac series 580, USA)를 이용하여 측정하였다. Column은 molecular sieve 5A (80/100 mesh)를 충전제로 사용한 1.8m×3.2mm stainless steel column을 이용하였다. Column, injector와 detector의 온도는 50, 80 및 90°C로 유지하였으며 운반기체는 30mL/min의 고순도 질소(99.999%)를 이용하였다.

배양 온도별 발생한 수소 가스는 정량적인 평가를 위해 식 (1) 및 (2)에 제시한 방법으로 표준 기압 및 온도로 보정하였다.

$$V_{H_2} (STPL/g VS) = V_{H_2} \times \frac{273}{(273 + T)} \times \frac{(760 - 42.2)}{760} \quad (1)$$

여기서 T는 배양 온도(°C),  $V_{H_2}$ 는 수소 발생량(mL)을 나타낸다.

$$V_{H_2,i} = V_{H_2,i-1} + C_{H_2,i} (V_{G,i} - V_{G,i-1}) / V_{H_2} (C_{H_2,i} - C_{H_2,i-1}) \quad (2)$$

여기서  $V_{H_2,i}$ 는 I회차의 수소 가스의 발생량,  $V_{G,i}$ 는 I회차의 바이오 가스 발생량,  $V_{G,i-1}$ 은 반응조 기상 부분의 체적,  $C_{H_2,i}$ 는 I회차의 수소 가스 함량을 나타낸다.

표준상태로 보정된 수소 발생량은 식 (3)에 제시한 수정된 Gompertz 식을 이용하여 동역학적 상수를 평가하였다.

$$H = P \exp \left[ - \exp \left\{ \frac{R_m e}{P} (\lambda - t) + 1 \right\} \right] \quad (3)$$

여기서, H는 누적 수소 전환율(mL H<sub>2</sub>/g dcw), P는 최대 수소 전환율(mL H<sub>2</sub>/g dcw), λ는 지체 시간(h), R은 최대 수소 발생 속도(mL H<sub>2</sub>/g dcw·h) 그리고 e는 지수를 나타낸다.

마지막으로 배양 온도에 대한 최대 수소 발생 속도의 영향을 평가하기 위해 Arrhenius 방정식을 이용하였다.

$$R' = A e^{(-E_a/R_g T_K)} \quad (4)$$

여기서 R'은 최대 수소 발생 속도(L/L/h), A는 Arrhenius 상수, E<sub>a</sub>는 활성화 에너지(kcal/mole), R<sub>g</sub>는 이상기체 상수(1.99 cal/mole·°K), T<sub>K</sub>는 절대 온도(K)를 나타낸다.

휘발성 지방산(volatile fatty acids, VFAs)은 HPLC (YL9100, 영린기기, 한국)를 이용하여 분석하였다. Column은 fast acid column (BIO-RAD, 100mm × 7.8mm)을 사용하였으며 운반 용매는 0.005M의 황산 용액을 이용하였다. 소화 슬러지의 VS와 알칼리도는 Standard Methods에 따라 실험을 수행하였다<sup>12)</sup>.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 배양 온도에 따른 수소 발생 특성

Fig. 1에는 배양 온도에 따른 누적 수소 발생량을 제시하였으며 Table 1에 정리하였다. 실험 결과에 따르면 배양 온도가 상승함에 따라 최대 수소 전환율 및 최대 수소 발생속도는 증가하는 경향으로 나타났다(Table 1). Yun 등(2013)의 연구에 따르면 *C. vulgaris*를 기질로 이용하여 증온(35°C) 혐기성 수소 발효 시 수소 전환율이 42.1mL H<sub>2</sub>/g dcw로 나타나 본 연구와 유사하게 나타났다<sup>13)</sup>. Roy 등(2014)은 산-열 처리된 *C. sorokiniana*를 기질로 이용하였으며 배양 온도 60°C에서 혐기성 수소 발효를 수행하였다. 그 결과 수소 전환율은 958mL H<sub>2</sub>/g dcw로 나타났다<sup>14)</sup>. Carver 등(2011)에 따르면 *C. vulgaris*를 기질로 이용하였으며 배양 온도는 60°C에서 수행하였다. 그 결과 수소 전환율은 172mL H<sub>2</sub>/g VS 나타났다<sup>15)</sup>. 본 연구 결과

와 상이한 결과를 나타낸 것은 조류의 구성 성분에 의한 것으로 판단된다. 또한, Roy 등(2014)과 Carver 등(2011)은 건조된 기질이 아닌 습윤 상태의 조류를 이용하였으며 운전 시 pH를 고정(6.5)하여 차이가 발생된 것으로 판단된다.

Arrhenius 방정식을 이용하여 활성화 에너지를 도출하였다(Fig. 2).

혼합 미생물을 이용하여 *C. vulgaris*의 혐기성 수소 발효 시 활성화 에너지는 36.24kcal/mol로 나타났다. Mu 등(2006)에 따르면 소화 슬러지(anaerobic sludge)를 식중 미생물로 이용하였으며 포도당을 기질로 이용하였을 경우 활성화 에너지는 25.63kcal/mol로 나타났다<sup>16)</sup>. Kumar와 Das(2000)의 연구에 따르면 순수 배양균(*Enterobacter cloacae* IIT-BT 08)를 이용하여 포도당의 혐기성 수소 발효 시 활성화 에너지는 12.84 kcal/mol로 나타났다<sup>17)</sup>. 또한, Fabiano와 Perego (2002)의 연구에서는 순수 배양균(*Enterobacter aerogenes*)을 이용한 전분(starch)의 혐기성 수소 발효 시 활성화

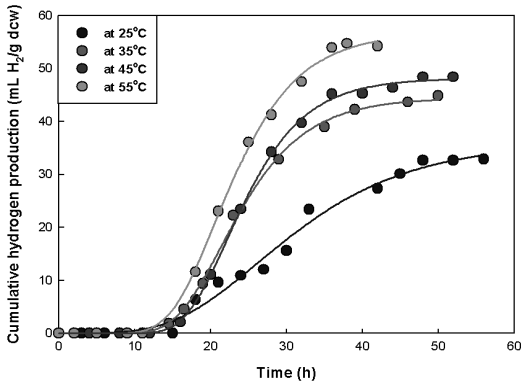


Fig. 1 Cumulative hydrogen production at different temperature

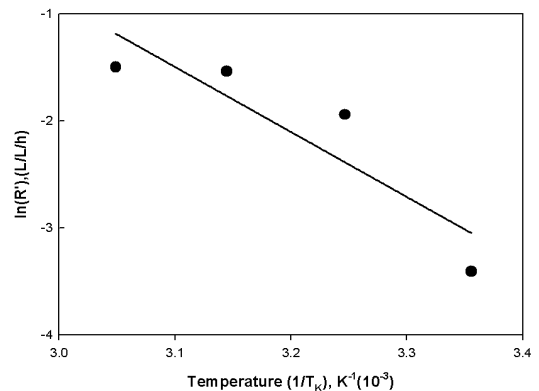


Fig. 2 Plot of temperature vs. hydrogen production rate for the determination of activation energy

Table 1 Kinetic parameters with various temperature conditions

Operation temperature(°C)	P (mL H <sub>2</sub> /g dcw)	R (mL H <sub>2</sub> /g dcw.h)
25	36.08 [0.68 mol H <sub>2</sub> /mol hexose]	1.49
35	44.47 [0.84 mol H <sub>2</sub> /mol hexose]	2.57
45	48.19 [0.91 mol H <sub>2</sub> /mol hexose]	3.07
55	56.77 [1.07 mol H <sub>2</sub> /mol hexose]	3.33

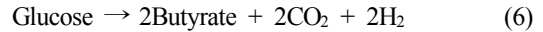
에너지는 16.03kcal/mol로 보고되었다<sup>18)</sup>. 따라서 본 연구와 선행 연구들의 결과를 토대로 고분자 물질이 저분자 물질에 비해, 혼합 미생물이 순수 배양균에 비해 높은 활성화 에너지가 필요한 것으로 나타났다.

**3.2 배양 온도에 따른 pH 및 휘발성 지방산의 변화**

Yun 등(2012)에 따르면 *C. vulgaris*를 이용한 혐기성 수소 발효 시 알칼리도가 상승하는 것으로 보고되었다<sup>11)</sup>. 따라서 본 연구에서는 별도의 pH 제어를 수행하지 않았다. Fig. 3에는 혐기성 수소 발효 시 배양 온도에 따른 pH 변화를 제시하였다.

배양 온도가 상승함에 따라서 최종 pH는 높게 나타났다. 상대적으로 온도가 낮은 25 및 35°C 구간에서는 pH 5.0-5.5로 유지되는 것으로 나타났다. 반면에 온도가 높은 45 및 55°C 구간에서는 pH 5.5-6.0으로 유지되었다. 고온(45 및 55°C)의 최대 수소 발생 속도가 중온(25 및 35°C)에 비해 높은 것으로 보아 상대적으로 많은 양의 알칼리도가 분출되어 최종 pH가 높은 것으로 판단된다.

혐기성 수소 발효 시 식 (5)-(6)과 같은 반응이 발생한다. 초산이 생성될 경우 4mol의 수소, 뷰틸산일 경우 2mol의 수소가 발생된다. 그러나 뷰틸산 생성 반응의 깁스 자유 에너지(Gibbs free energy)가 초산 생성 반응에 비해 낮아 뷰틸산 생성이 우점화 된다<sup>19)</sup>.



혐기성 수소 발효 시 젖산이 생성될 경우 수소가 발생하지 않는다(식 (7)-(9))<sup>20)</sup>.



그러나 젖산의 경우 *C. acetobutylicum*에 의해 산화되어 뷰틸산이 되며 그 과정에서 수소가 발생한다(식 (10))<sup>21)</sup>.

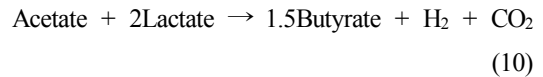


Fig. 4에는 각 배양 온도별 휘발성 지방산의 농도를 제시하였다. 배양 온도가 상승함에 따라 프로피온산의 농도는 큰 변화가 나타나지 않았다.

젖산, 초산 및 뷰틸산의 경우 25°C에서 35°C로 증가함에 따라 모두 증가하는 경향을 나타냈다. 35°C에서 55°C로 증가함에 따라 뷰틸산은 큰 변화가 없으나

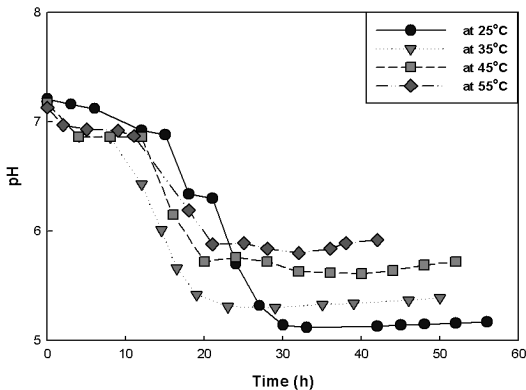


Fig. 3 The time courses of pH change at various temperature

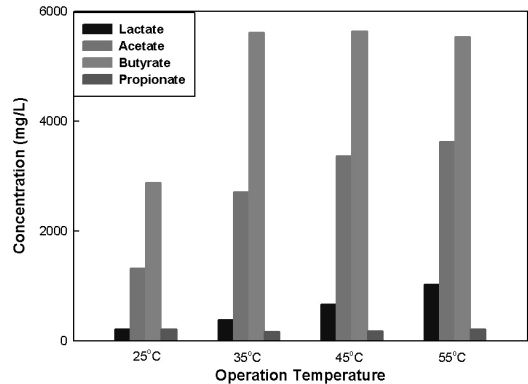


Fig. 4 VFAs concentration at various temperature

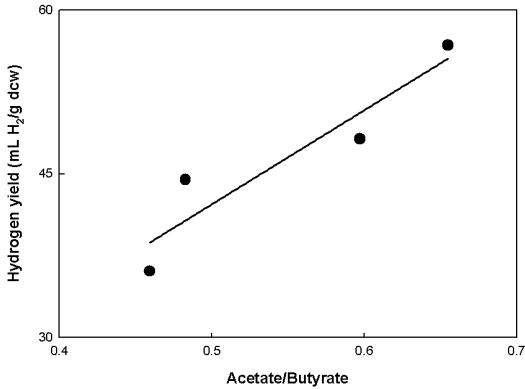
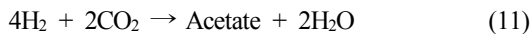


Fig. 5 Relationship between acetate/butyrate ratio and H<sub>2</sub> yield

초산과 젖산의 농도가 각각 33.7 및 170.0% 증가한 것으로 나타났다. 배양 온도가 상승함에 따라서 초산과 젖산의 농도가 증가하였고, 이에 따라 식 (10)과 같은 반응에 의해 수소 전환율이 상승한 것으로 판단된다.

초산과 뷰틸산은 혐기성 수소 발효 시 주요 지표로서 활용된다. 특히, 혼합 미생물을 이용할 경우 뷰틸산 또는 뷰틸산/초산의 비와 수소 전환율은 매우 밀접한 관계를 가지는 것으로 보고되었다<sup>22)</sup>. 그러나 초산의 경우 식 (5)에는 수소 생성 시 부산물로, 식 (9)에는 젖산 생성 시 부산물로, 식 (10)에서는 젖산이 산화될 경우 사용되는 것으로 보고되었다. 또한 식 (11)과 같이 수소가 소모되는 반응 시 부산물로도 발생한다<sup>19)</sup>.



따라서 본 연구에서는 초산/뷰틸산의 비율과 수소 전환율의 관계를 제시하였다(Fig. 5). 배양 온도가 증가함에 따라 초산/뷰틸산의 비가 증가하였으며 수소 전환율도 증가하였다. 또한, 초산/뷰틸산의 비와 수소 전환율은 선형적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

#### 4. 결 론

본 연구는 미세조류인 *C. vulgaris*를 이용한 증온 (25, 35°C) 및 고온(45, 55°C) 혐기성 발효의 수소 발

효 특성을 평가하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 배양 온도가 상승함에 따라 최대 수소 발생 속도 및 수소 전환율은 상승하였다. 또한, Arrhenius 방정식을 이용한 활성화 에너지는 36.24kcal/mol로 나타났다.
- 2) 배양 온도가 상승함에 따라 뷰틸산 농도는 큰 변화가 없었으나 초산과 젖산의 경우 최대 33.7 및 170.0% 증가된 것으로 나타났다.
- 3) 본 연구를 통해 미세조류를 이용한 혐기성 수소 발효 시 배양 온도에 대한 영향을 평가하였다. 향후 미세조류를 이용한 에너지 생산 연구 시 기초 자료로 활용될 것으로 기대된다.

#### 후 기

이 논문은 2013년도 한국방송통신대학교 학술연구비 지원을 받아 작성된 것이며 이에 감사드립니다.

#### References

1. G. Cipriani, V. D. Dio, F. Genduso, D. L. Cascia, R. Liga, R. Miceli, and G. R. Galluzzo, "Perspective on hydrogen energy carrier and its automotive applications", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 39, No. 16, 2014, pp. 8482-8494.
2. Y. J. Lee, D. Y. Kim, M. H. Han, K. S. Kang, G. G. Bae, and J. H. Lee, "Electrodeposition characteristics of corrosion resistant tantalum coating layer for hydrogen production sulfide-iodine process", *Trans. of the Korean Hydrogen and New Energy Society*, Vol. 23, No. 6, 2012, pp. 573-580.
3. J. Wang and W. Wan, "Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 34, No. 1, 2009, pp. 235-244.
4. Y. H. Jo, B. H. Jo, and H. J. Cha, "Hydrogen production in biological way as alternative energy",

- J of Korea Organic Resource Recycling Association, Vol. 19, No. 1, 2011, pp. 57-63.
5. J. M. Choi, "Optimization of hydrogen production from microalgae using anaerobic fermentation", Master dissertation, The Univ. of Suwon, 2012.
  6. J. L. Wang, and W. Wan, "Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed culture", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 33, No. 20, 2008, pp. 5392-5397.
  7. H. M. Y. Nazlina, A. R. N. Aini, F. Ismail, and M. S. M. Yusof, "Effect of different temperature, initial pH and substrate composition on biohydrogen production from food waste in batch fermentation", *Asian Journal of Biotechnology*, Vol. 1, No. 2, 2009, pp. 42-50.
  8. P. E. P. Koskinen, C. H. Lay, S. B. Beck, K. E. S. Tolvanen, A. H. Kaksonen, and J. Örlygsson, C. Y. Lin, and J. A. Puhakka, "Bioprospecting thermophilic microorganisms from Icelandic hot spring for hydrogen and ethanol production", *Energy & Fuels*, Vol. 22, 2008, pp. 134-140.
  9. S. A. Scott, M. P. Davey, J. S. Dennis, I. Horst, C. J. Howe, D. J. Smith, and A. G. Smith, "Biodeisel from algae: Challenges and prospects", *Energy Biotechnology-Environmental Biotechnology*, Vol. 21, No. 3, 2010, p. 277-286.
  10. K. W. Jung, D. H. Kim, and H. S. Shin, "Fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* and optimization of thermal pretreatment conditions", *Bioresource Technology*, Vol. 102, No. 3, 2011, pp. 2745-2750.
  11. Y. M. Yun, K. W. Jung, D. H. Kim, Y. K. Oh, and H. S. Shin, "Microalgal biomass as a feedstock for bio-hydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 37, No. 20, 2012, pp. 15533-15539.
  12. APHA-AWWA-WEF, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 18th edition, American Public Health Assoc., Washington, D. C., USA, 1992.
  13. Y. M. Yun, K. W. Jung, D. H. Kim, Y. K. Oh, S. K. Cho, and H. S. Shin, "Optimization of dark fermentative H<sub>2</sub> production from microalgal biomass by combined (acid+ultrasonic) pretreatment", *Bioresource Technology*, Vol. 141, 2013, pp. 220-226.
  14. S. Roy, K. Kumar, S. Ghosh, and D. Das, "Thermophilic biohydrogen production using pre-treated algal biomass as substrate", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 61, 2014, pp. 157-166.
  15. S. M. Carver, C. J. Hulatt, D. N. Thomas, and O. H. Tuovinen, "Thermophilic, anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H<sub>2</sub> production", *Biodegradation*, Vol. 22, No. 4, 2011, pp. 804-814.
  16. Y. Mu, X. J. Zheng, H. Q. Yu, and R. F. Zhu, "Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 31, 2006, pp. 780-785.
  17. N. Kumar, and D. Das, "Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 35, 2000, pp. 589-593.
  18. B. Fabiano, and P. Perego, "Thermophilic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 27, 2002, pp. 149-156.
  19. D. H. Kim, S. K. Han, S. H. Kim, and H. S. Shin, "Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 31, No. 15, 2006, pp. 2158-2169.
  20. D. H. Kim, S. H. Kim, and H. S. Shin, "Sodium inhibition of fermentative hydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 34, 2009, pp. 3295-3304.
  21. Y. M. Yun, D. H. Kim, Y. K. Oh, H. S. Shin, and K. W. Jung, "Application of a novel enzyme pretreatment using crude hydrolytic extracellular enzyme solution to microalgal biomass for dark fermentative hydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 159, 2014, pp. 365-372.