

단백질을 이용한 혐기성 수소 발효시 부산물 발생 특성 평가

이채영^{1,†} · 한선기²

¹수원대학교 토목공학과, ²한국방송통신대학교 환경보건학과

Characteristics of Byproducts during Anaerobic Hydrogen Fermentation Using Protein

CHAE-YOUNG LEE^{1,†}, SUN-KEE HAN²

¹Department of Civil Eng., The University of Suwon, 17 Wauan-gil, Bongdam-eup, Hwaseong 18323, Korea

²Department of Environmental Health, Korea National Open University, 86 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03087, Korea

†Corresponding author :
Chaeyoung@suwon.ac.kr

Received 4 October, 2018
Revised 30 October, 2018
Accepted 30 October, 2018

Abstract >> This study was performed to evaluate initial pH and substrate concentration on hydrogen fermentation of protein. The optimum initial pH and substrate concentration of hydrogen fermentation using protein was 8.0 and 1.0 g peptone/L, respectively. The maximum hydrogen yield at initial pH 8.0 and 1.0 g peptone/L was 19.2±0.8 mL H₂/g peptone. As results of VFAs analysis, percentages of valerate was similar to hydrogen yield. Also, *C. stickalandii*, which was hydrogen and valerate producing bacteria, was dominated.

Key words : Anaerobic hydrogen fermentation(혐기성 수소 발효), Protein(단백질), Hydrogen yield(수소 수율), Acetate/butyrate ratio(초산이온/낙산이온 비), Aceate/valerate ratio(초산이온/길초산이온 비)

1. 서론

수소는 242 kJ/mol의 발열량을 가지고 있는 이상적인 에너지 매체이다. 수소를 생산하는 대표적인 방법으로는 물 전기분해, 증기 메탄 개질화, 수성가스 전화 반응 등이 있다^{1,2)}. 이러한 방법들은 화석 연료를 이용하여 많은 에너지를 필요로 하는 단점이 있다. 최근 주목받고 있는 생물학적 수소 생산 방법은 유기성 폐기물과 같은 바이오매스로부터 에너지를 회수할 수 있는 장점이 있다. 또한 발생하는 부산물들은 의약, 화장품 등과 같은 화학분야 및 바이오연

료 산업에도 활용 가능하다³⁻⁵⁾.

수소를 생산할 수 있는 생물학적 공정에는 광발효(photo fermentation) 그리고 혐기성 발효(anaerobic or dark fermentation) 등이 있다^{6,7)}. 혐기성 수소 발효의 경우 빛이 없는 조건에서 생산이 가능하며 발생 속도가 빠르고 음식물류 폐기물, 도시 고형 폐기물 등과 같이 적용 가능한 기질의 폭이 넓다는 장점을 가지고 있다^{8,9)}.

음식물류 폐기물, 하수슬러지, 가축분뇨, 농장 부산물 그리고 미세조류 등 다양한 바이오매스들이 혐기성 수소 발효의 원료로 이용 가능하다. 이러한 바

이오매스들은 대부분 탄수화물과 단백질로 구성되어 있다. 전분(starch) 그리고 셀룰로오스(cellulose) 등으로 이루어진 탄수화물은 단백질에 비하여 혐기성 수소 발효의 원료로 더 많이 활용되고 있다¹⁰⁾. 이러한 원인은 탄수화물이 수소 생성 미생물(hydrogen-producing bacteria, HPB)에 의하여 포도당(glucose)과 목당(xylose) 같은 저분자 물질로 환원되기 상대적으로 쉽기 때문이다^{11,12)}.

단백질은 탄수화물과 더불어 바이오매스를 구성하는 주요 물질 중 하나이다. 미세조류 중 *Arthrospira*는 단백질 함량이 72% 이상이며 가축분뇨 폐수의 경우 화학적 산소 요구량(chemical oxygen demand, COD)의 40%를 단백질이 차지하고 있다^{13,14)}. 단백질이 분해되어 생성되는 아미노산(amino acids)은 탄수화물과는 달리 수소 생성 미생물에 의하여 쉽게 분해되지 않는다. 이러한 원인은 분자적 구조와 낮은 탄소/질소 비(Carbon/Nitrogen ratio)로 보고되고 있다¹⁵⁾.

Bai 등¹⁶⁾은 탄수화물과 단백질이 혼합된 물질을 기질로 혐기성 수소 발효 특성을 평가하였다. 단백질은 펩톤(peptone), 탄수화물은 포도당과 전분을 각각 이용하였다. 탄수화물의 물질에 따라 최대 수소 수율이 발생하는 탄수화물/단백질 비율이 다른 것으로 보고하였다. 포도당을 이용하는 경우 탄수화물/단백질 비는 1.5:1, 전분을 이용하는 경우 4:1로 나타났다¹⁶⁾. Cheng 등¹⁷⁾은 단백질이 분해되어 생성되는 아미노산(amino acids)을 이용하여 수소 수율을 평가하였다. 혐기성 수소 발효시 초기 pH는 6.0으로 고정하였으며 기질의 농도는 8.3 g amino acids/L로 수행하였다. 사용된 아미노산 중 알라닌(alanine)이 16.2 mL H₂/g amino acid로 가장 높게 나타났으며 대부분 5.0 mL H₂/g amino acid 이하로 보고되었다¹⁷⁾. Xiao 등¹⁸⁾은 단백질을 기질로 이용하여 초기 pH를 중성 범위로 고정하였으며 기질의 농도는 0.3-2.7 g/L 범위로 수소 수율을 평가하였다. 그 결과에 따르면 0.3g/L의 기질농도에서 0.077 mL H₂/mg protein으로 수율이 가장 높게 나타났으며 농도가 낮을수록 수소 수율이 증가하는 경향으로 보고되었다¹⁸⁾.

선행 연구들을 살펴보면 단백질을 이용한 혐기성 수소 발효시 기질 농도에 대한 연구들이 진행되었으나 수율은 상이한 결과를 보였다. 또한 초기 pH는 선행 연구들에 따라 다르게 적용되었으며 부산물에 대한 평가는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 펩톤을 이용하여 단백질의 혐기성 수소 발효시 초기 pH와 농도에 따른 수소 및 부산물 발생 특성에 대하여 평가하였다.

2. 실험

2.1 식종 미생물 및 기질

2.1.1 식종 미생물

본 연구에서 식종 미생물은 H시에 위치한 하수처리시설 내 혐기성 소화조의 유출수를 이용하였다. 소화조의 유출수는 불순물 제거를 위하여 4 mm 체를 이용하여 거른 후 수소와 무관한 미생물의 성장 억제를 위하여 90°C에서 20분간 전처리하였다. 식종 미생물의 총 고형물(total solids, TS), 휘발성 고형물(volatile solids, VS) 및 pH는 각각 19.3±1.2 g/L, 15.4±0.8 g/L, 7.3±0.1이다.

2.1.2 기질

본 연구에서는 기질에 대한 영향을 줄이기 위하여 펩톤을 이용하였다. 기질의 농도는 0.1-10.0 g peptone/L 범위로 선정하였다.

2.2 혐기성 수소 실험

2.2.1 반응기

혐기성 수소 반응기는 유효체적이 300 mL인 아크릴 재질의 반응기를 이용하였다. 반응기에는 가스의 시료채취를 위한 배출구와 pH 측정을 위하여 센서가 장착 가능하도록 구성하였다. 반응기는 온수순환펌프가 장착된 온탕기에서 배양되었으며 온도는 35±1°C로 중온 조건에서 고정하였다.

2.2.2 식종

수소 암발효 실험을 위하여 전처리된 식종 미생물을 유효체적의 30%를 채우고 기질 농도에 맞춰 배지와 혼합 후 나머지 부분을 채웠다. 식종 미생물, 기질 그리고 배지를 반응기에 채운 후 초기 pH를 4.0-9.0 범위로 5N KOH와 3N HCl을 이용하여 조정하였다. 초기 pH를 조정된 반응기는 질소가스로 탈기하여 혐기성 조건으로 치환하였다.

2.3 분석 및 해석 방법

바이오가스 발생량은 체적 측정이 가능한 유리 주사기를 이용하여 반응조 상단 가스 배출구를 통하여 측정하였다. 수소의 함량은 gas-tight syringe를 이용하여 일정량을 채취한 후 열전도도검출기(Thermal Conductivity Detector, TCD)가 장착된 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography, Gow Mac series 580, USA)를 이용하였다. GC의 운반기체로는 초고순도 질소(99.999%)를 30 mL/min의 유속으로 흘려보냈다. Column은 stainless steel 재질에 1.8 m×3.2 mm로 내부를 molecular sieve 5A (80/100 mesh)를 충전한 것으로 이용하였다. GC의 운영 조건은 column이 50°C, injector가 80°C 그리고 detector가 90°C로 유지하였다.

발생된 수소가스는 수정된 Gompertz 식을 이용하여 동역학적 상수를 도출하였다(식 [1]).

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

여기서, H는 누적 수소 수율(mL H₂/g peptone), P는 최대 수소 수율(mL H₂/g peptone), R_m은 최대 수소 발생 속도(mL H₂/g peptone.d), λ는 지체시간(d) 그리고 e는 지수를 나타낸다.

식종 미생물의 TS, VS는 Standard Methods에 준하여 수행하였으며 pH는 Orion 8102 BNUWP ROSS Ultra[®] 전극(Thermo Scientific, USA)을 이용하여 측정하였다.

휘발성 지방산(Volatile Fatty Acids, VFAs)은 자외선 검출기(ultraviolet detector)가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC, YL-9100, Young-Lin Inc., Korea)를 이용하였다. HPLC의 column은 fast acid column (100 mm×7.8 mm, BIO-RAD, USA)을 장착하였으며 유동상 물질은 0.005M H₂SO₄를 이용하였다.

미생물 분석은 pyrosequencing 454 기법을 이용하였으며 분석 전에 미생물 시료는 -20°C에 보관하였다. 미생물의 분석을 위하여 16S rRNA 유전자의 DNA 추출은 Ultraclean Soil DNA kit (MoBio Laboratory Inc., USA)를 이용하였다. 추출된 DNA는 27F ((5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3'))와 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 미생물 DNA는 중합효소 연쇄반응을 거쳐 Roche GS FLX 454 pyrosequencing 플랫폼을 이용하여 400 bp 단위로 생성하였다. 미생물 군집 분석은 RDP 분석표를 이용하여 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 단백질의 혐기성 수소 발효시 초기 pH의 영향

기질 농도는 0.5 g peptone/L로 고정하였으며 초기 pH는 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 및 9.0으로 수행하였다

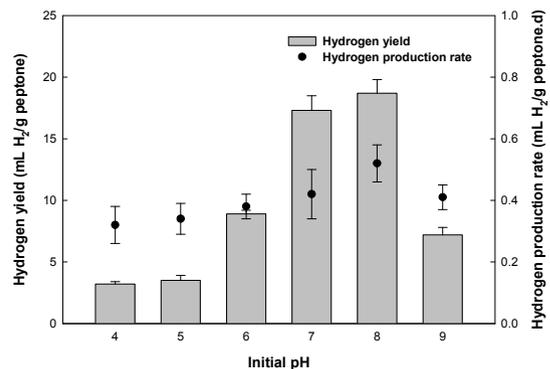


Fig. 1. Hydrogen production of peptone with different initial pH

(Fig. 1, Table 1). 혐기성 수소 발효 중 별도의 pH를 조절하지 않았으나 초기 pH에서 큰 변화는 나타나지 않았다.

초기 pH 8.0에서 수소 수율이 18.7±1.1 mL H₂/g peptone, 최대 수소 발생 속도는 0.5±0.06 mL H₂/g peptone.d로 가장 높게 나타났다. 초기 pH 4.0-8.0 범위 내에서는 수소 수율이 점차 증가하는 경향으로 나타났다으나 초기 pH 9.0에서는 감소하였다. Lee 등¹⁹⁾은 음식물류 폐기물을 기질로 이용하였으며 초기 pH는 8.0, 운전 pH는 5.3이 최적으로 나타났다. Akroum-Amrouche 등²⁰⁾의 연구에 따르면 포도당을 기질로 이용하는 경우 최적의 초기 pH는 6.5로 나타났다. 혐기성 수소 발효시 초기 pH 또는 운전 pH가 낮을 경우에는 산 생성이나 알코올 생성 물질 대사 경로가 발현되어 미생물 스스로 pH를 유지하기 위한 능력이 감소된다²⁰⁾. 반면 pH가 높을 경우에는 미생물이 기질 소모 후 개미산(formic acids) 배출함에 따라 H₂와 CO₂ 생성에 관한 활성이 감소하게 된다. 이로 인하여 수소 수율이 낮아지게 된다²⁰⁾. 이러한 원인으로 초기 pH는 수소 수율에 영향을 미치며 기질에 따라 최적의 pH가 다르게 나타난다.

탄수화물이 풍부한 바이오매스의 경우 초기 pH를 높게 하는 이유는 젖산(lactic acids)의 생성을 억제하는데 있다¹⁹⁾. 반면 하수슬러지나 가축분뇨 같은 단백질이 풍부한 바이오매스에서는 알칼리성 pH (8.5-10.0) 범위에서 수소 수율이 높은 것으로 나타났다²¹⁾. 이러한 결과는 알칼리성 pH에서 단백질의 수용성이 증가함에 기인한다. 선행 연구와 본 연구의

결과들을 살펴보면 단백질의 혐기성 수소 발효시 최적의 초기 pH는 알칼리성 범위인 8.0으로 나타났으며 이 때 수소 수율과 최대 수소 발생 속도가 가장 높은 것으로 나타났다.

3.2 단백질의 혐기성 수소 발효시 기질 농도의 영향

초기 pH 실험 결과를 바탕으로 기질의 농도별 혐기성 수소 발효를 수행하였다. 그 결과에 따르면 수소 수율은 기질 농도가 0.1-1.0 g peptone/L 구간까지는 증가하는 경향이지만 그 이후에는 감소하였으며 2.5 g peptone/L에서는 급격한 변화폭을 보였다. 반면에 최대 수소 발생 속도는 기질 농도가 증가함에 따라 지속적으로 감소하는 추세로 나타났다(Fig. 2, Table 2).

Cheng 등¹⁷⁾에 따르면 단백질이 분해되어 생성되

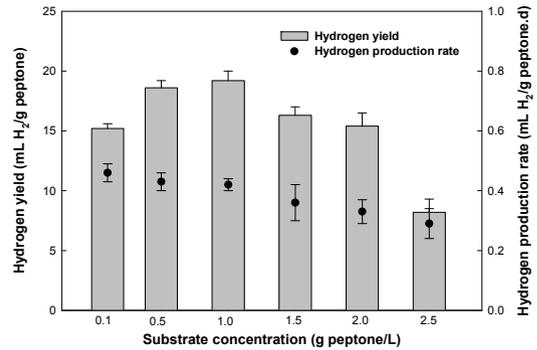


Fig. 2. Hydrogen production of peptone with different substrate concentration

Table 1. Characteristics of hydrogen production with different initial pH

Initial pH	P (mL H ₂ /g peptone)	R _m (mL H ₂ /g peptone.d)
4.0	3.2±0.2	0.3±0.06
5.0	3.5±0.4	0.3±0.05
6.0	8.9±0.3	0.4±0.04
7.0	17.3±1.2	0.4±0.08
8.0	18.7±1.1	0.5±0.06
9.0	7.2±0.6	0.4±0.04

Table 2. Characteristics of hydrogen production with different substrate concentration

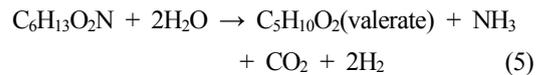
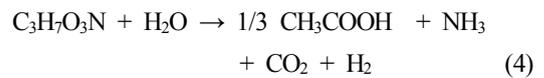
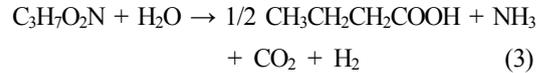
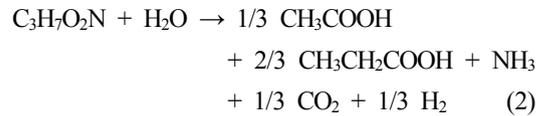
Substrate concentration (g peptone/L)	P (mL H ₂ /g peptone)	R _m (mL H ₂ /g peptone.d)
0.1	15.2±0.4	0.5±0.03
0.5	18.6±0.6	0.4±0.03
1.0	19.2±0.8	0.4±0.02
1.5	16.3±0.7	0.4±0.06
2.0	15.4±1.1	0.3±0.04
2.5	8.2±1.1	0.3±0.05

는 아미노산을 이용하여 혐기성 수소 발효 실험을 수행하였다. 기질의 농도는 8.3 g amino acid/L이며 수소 수율은 아미노산 종류에 따라 다르긴 하나 0.2-16.2 mL H₂/g amino acid 범위로 나타났다. 알라닌(alanine)과 아르기닌(arginine)을 제외하고는 5 mL H₂/g amino acid 이하로 나타났다¹⁷⁾. Akutsu 등²²⁾은 펩톤을 5 g/L로 실험을 수행하였으나 수소 발생이 거의 없는 것으로 보고하였다. 선행 연구들이 본 연구에 비하여 높은 농도로 실험을 수행하였으나 본 연구 결과에 추세로 보았을 때 유사한 결과로 추정할 수 있다. Xiao 등²¹⁾에 따르면 단백질의 농도가 2 g/L 이하일 경우 수소 수율은 20 mL H₂/g protein보다 낮은 것으로 보고하였다. 본 연구 결과에서는 1.0 g peptone/L에서 수소 수율이 19.2±0.8 mL H₂/g peptone로 가장 높게 나타났으며 2.0 g peptone/L에서는 15.4±1.1 mL H₂/g peptone로 선행 연구 결과와 유사하게 나타났다.

3.3 단백질 혐기성 수소 발효시 부산물 발생 및 미생물 군집 특성

단백질 농도별 혐기성 수소 발효 반응 후 부산물과 미생물 군집 분석을 수행하였다. 부산물은 휘발성 지방산을 수행하였다(Fig. 3). 기질의 농도가 증가할수록 초산이온(acetate)의 비율은 감소하는 경향으로 나타났으며 길초산이온(valerate)은 점차 증가하였다. 그에 반하여 낙산이온(butyrate)과 프로피온산이온

(propionate)은 기질 농도에 따라 크게 변화하지 않는 것으로 나타났다.



단백질이 분해되어 생성되는 아미노산의 경우 식 (2)-(5)와 같이 분해될 수 있으며 그 과정에서 수소를 생산할 수 있다. 초산이 생성되는 경우 1 mol 또는 1/3 mol의 수소가 발생하며 낙산이 생성되는 경우 수소가 1 mol 발생한다. 반면 길초산이 생성되는 경우에는 2 mol의 수소가 발생하는 것으로 나타났다.

또한 수소 발효시 초산이온보다는 낙산이온 생성 반응이 안정성 측면에서 유리한 것으로 알려져 있다²³⁾. 단백질을 이용하는 경우 초산이온/낙산이온 비뿐만

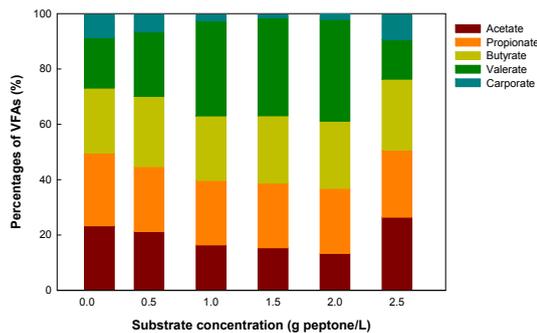


Fig. 3. VFAs in the residual solutions of hydrogen fermentation of peptone with different substrate concentration

Table 3. Acetate/butyrate and acetate/valerate ratio of hydrogen fermentation of peptone

Substrate concentration (g peptone/L)	Acetate/butyrate	Acetate/valerate
0.1	1.0	1.3
0.5	0.8	0.9
1.0	0.7	0.5
1.5	0.6	0.4
2.0	0.5	0.4
2.5	1.0	1.8

Table 4. Relative abundance of *C. sticklandii*, *C. perfringens* and *C. acetobutylicum* in hydrogen fermentation

Substrate concentration (g peptone/L)	<i>C. sticklandii</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	Others
0.1	20.3	33.4	17.4	28.9
0.5	24.8	32.8	13.4	29.0
1.0	26.8	36.1	10.2	26.9
1.5	34.3	34.1	8.4	23.2
2.0	43.3	34.2	12.4	10.1
2.5	21.2	34.1	21.4	23.3

아니라 초산이온/길초산이온 비가 수소 수율과 유사한 경향으로 나타났다(Table 3). 즉, 단백질의 혐기성 분해시 낙산이온과 길초산이온의 비율이 높을수록 수소 수율이 높은 것으로 나타났다. 초산 이온의 비율이 높을 경우 수소를 소모하는 반응에 의하여 생성된 것으로 추정된다(식 [6]).

따라서 본 연구 결과에 따르면 기질 농도별 휘발성 지방산의 비율이 다르게 나타났으며 주로 낙산이온과 길초산이온 생성 반응에 따라 수소가 발생하였으며 초산이온 생성 반응을 통하여 소모된 것으로 판단된다.

미생물 군집 분석은 *Clostridium sticklandii*, *Clostridium perfringens* 및 *Clostridium acetobutylicum*에 관한 비율을 조사하였다(Table 4). *C. sticklandii*는 단백질로부터 길초산에 생성에 관여하는 미생물이며 *C. perfringens*는 초산 생성 그리고 *C. acetobutylicum*은 초산 소모에 관여하는 미생물이다.

*C. sticklandii*는 기질 농도 증가에 따라 점차 증가하는 경향으로 나타났으며 2.5 g peptone/L에서 감소하였다. 반면 *C. acetobutylicum*은 *C. sticklandii*의 경향과는 달리 기질농도 증가에 따라 점차 감소하였으며 2.5 g peptone/L에서 증가하였다. *C. perfringens*는 기질 농도와는 무관하게 일정 비율을 유지하였다. 이는 부산물인 휘발성 지방산과 수소 수율의 경향과 유사한 것으로 나타났다. 즉, 길초산을 생성하는 미생물이 증가하고 초산을 소모하는 미생물이 감소할수록 수소 수율이 증가하는 것으로 나타났다.

4. 결론

본 연구에서는 단백질의 수소 발효 특성과 이에 따른 부산물 평가를 수행하였다.

1) 단백질 수소 발효시 적정 초기 pH는 8.0으로 나타났으며 별도의 pH 변화 없이 유지되는 것으로 나타났다. 이때의 수소 수율은 18.7 mL H₂/g peptone으로 나타났다.

2) 미생물 군집 평가 결과에 따르면 단백질 분해시 초산을 생성하는 *Clostridium perfringens*와 길초산을 생성하는 *Clostridium sticklandii*가 증가할수록 수소 수율이 높은 것으로 나타났다. 반면, 수소 수율이 낮을 때에는 수소를 소모하여 초산을 생성하는 *Clostridium acetobutylicum*의 비율이 증가하는 것으로 나타났다.

3) 본 연구는 단백질의 수소 발효시 부산물과 미생물 군집에 관하여 평가하였으며 이 결과는 향후 바이오매스를 이용한 수소 에너지 생산 분야의 안정적인 운영을 위한 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

후 기

이 논문은 2017년도 한국방송통신대학교 학술연구비 지원을 받아 작성된 것이며 이에 감사드립니다.

References

1. A. Obradovic, B. Likozar, and J. Levec, "Catalytic surface development of novel nickel plate catalyst with combined

- thermally annealed platinum and alumina coating for steam methane reforming”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 38, 2013, pp. 1419-1429.
2. A. Obradovic, B. Likozar, and J. Levec, “Steam methane reforming over Ni-based pellet-type and Pt/Ni/Al₂O₃ structured plate-type catalyst: intrinsic kinetics study”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 52, 2013, pp. 13597-13606.
 3. J. Wang and W. Wan, “Factors influencing fermentative hydrogen production: a review”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 34, 2009, pp. 799-811.
 4. M. Sostaric, D. Klinar, M. Bricelj, J. Golob, M. Berovic, and B. Likozar, “Growth lipid extraction and thermal degradation of the microalga *Chlorella vulgaris*”, *New Biotechnol.*, Vol. 29, 2012, pp. 325-331.
 5. Z. Yang, R. Guo, X. Xu, X. Fan, and S. Luo, “Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgal biomass residues”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 36, 2011, pp. 3465-3470.
 6. D. Call and B. E. Logan, “Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane”, *Environmental Science and Technology*, Vol. 42, 2008, pp. 3401-3406.
 7. L. B. Brentner, J. Peccia, and J. B. Zimmerman, “Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: Implications for a research agenda”, *Environmental Science and Technology*, Vol. 44, 2010, pp. 2243-2254.
 8. X. Gómez, C. Fernández, J. Fierro, M. E. Sánchez, A. Escapa, and A. Morán, “Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation”, *Bioresource Technology*, Vol. 102, 2011, pp. 8621-8627.
 9. H. S. Lee, W. F. Vermaas, and B. E. Rittmann, “Biological hydrogen production: Prospects and challenges”, *Trends in Biotechnology*, Vol. 28, 2010, pp. 262-271.
 10. D. Li, Z. Yuan, Y. Sun, X. Kong, and Y. Zhang, “Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 34, 2009, pp. 812-820.
 11. C. Lin and C. Cheng, “Fermentative hydrogen production xylose using anaerobic mixed microfla”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 31, 2006, pp. 832-840.
 12. H. Su, J. Cheng, J. Zhou, W. Song, and K. Cen, “Combination of dark- and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 34, 2009, pp. 8846-8853.
 13. G. C. Dismukes, D. Carrieri, N. Bennette, G. M. Anayev, and M. C. Posewitz, “Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, Vol. 19, 2008, pp. 235-240.
 14. J. W. Barnett, G. J. Kerridge, and J. M. Ressel, “Effluent treatment systems for the dairy industry”, *Aust. Biotechnol.*, Vol. 4, 1994, pp. 26-30.
 15. A. Xia, J. Cheng, R. Lin, J. Liu, J. Zhou, and K. Cen, “Sequential generation of hydrogen and methane from glutamic acid through combined photo-fermentation and methanogenesis”, *Bioresour. Technol.*, Vol. 131, 2013, pp. 146-151.
 16. M. Bai, S. Cheng, and Y. Chao, “Effects of substrate components on hydrogen fermentation of multiple substrates”, *Water Sci. Technol.*, Vol. 50, 2004, pp. 209-216.
 17. J. Cheng, L. Ding, A. Xia, R. Lin, Y. Li, J. Zhou, and K. Cen, “Hydrogen production using amino acids obtained by protein degradation in waste biomass by combined dark- and photo-fermentation”, *Bioresour. Technol.*, Vol. 179, 2015, pp. 13-19.
 18. B. Xiao, Y. Han, and J. Lin, “Evaluation of biohydrogen production from glucose and protein at neutral initial pH”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 35, 2010, pp. 6152-6160.
 19. C. Lee, S. Lee, and S. Hwang, “Effect of heat treatment on the start-up performance for anaerobic hydrogen fermentation of food waste”, *Trans. of the Korean Hydrogen and New Energy Society*, Vol. 22, No. 6, 2011, pp. 765-771.
 20. D. Akroum-Amrouche, H. Lounici, N. abdi, and N. Mameri, “Dark fermentative hydrogen production rate from glucose using facultative anaerobic bacteria *E. coli*”, *International Conference on Control, Engineering & Information Technology 2014, Proceeding Engineering & Technology*, 2014, Sousse, Tunisia.
 21. N. Xiao, Y. Chen, A. Chen, and L. Feng, “Enhanced bio-hydrogen production from protein wastewater by altering protein structure and amino acids acidification type”, *Scientific Reports*, Vol. 4, 2014, pp. 1-9.
 22. Y. Akutsu, D. Y. Lee, Y. Y. Li, and T. Noike, “Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microfla”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 34, 2009, pp. 5365-5372.
 23. D. H. Kim, S. H. Kim, and H. S. Shin, “Sodium inhibition of fermentative hydrogen production”, *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 34, 2009, pp. 3295-3304.