

Polyvinylalcohol에 고정된 시금치 엽록체와 백금 촉매를 이용한 광수소 발생

朴仁虎·沈恩貞·李鎭範*·李蕙珠·嚴慶一·鮮于洋一
(동아대학교 자연과학대학 생물학과, *동의대학교 자연과학대학 생물학과)

Photoproduction of Hydrogen in Polyvinylalcohol-Immobilized Spinach Chloroplasts with Platinum Catalysts

Park, In Ho, Eun Jung Sim, Chin Bum Lee*, Hye Joo Lee, Kyungil Um and Yangil Sunwoo

(Department of Biology, Dong-A University, Pusan and

*Department of Biology, Dongeui University, Pusan)

ABSTRACT

Photoproduction of hydrogen by free and polyvinylalcohol (PVA)-immobilized spinach chloroplasts was investigated. Immobilization of chloroplast with PVA increased the functional stability of the chloroplast during storage. PVA-immobilized chloroplasts preserved photosynthetic electron transport activity much better than free chloroplasts. The hydrogen production of free chloroplast decreased to 17% of initial activity after storage of six days. The hydrogen production of the PVA-immobilized chloroplasts, however, showed 44% of initial activity after storage of 15 days. The maximal rate of hydrogen production was accomplished at 27°C under the light intensity above $116 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. The amount of hydrogen produced was proportional to the chlorophyll concentration. The hydrogen production was inhibited by DCMU treatment, indicating hydrogen production is dependent on photosynthetic electron transport. These results suggest that PVA is a good candidate for the immobilization matrix of chloroplasts for the photoproduction of hydrogen.

서론

광에 의한 생물학적 수소 발생은 Gaffron과 Rubin(1942)에 의하여 *Scenedesmus*에서 처음으로 보고된 후 다른 여러 녹조류에서도 이와 같은 현상이 관찰되었으며 녹조와 남조류 등은 혐기적 조건하에서 H⁺의 환원반응을 수행하는데 이를 촉매하는 효소는 hydrogenase 혹은 nitrogenase로 알려져 있다(Kessler, 1974; Francis and Senger, 1985).

한편 고등 식물의 경우 자연 상태에서는 광계 II에 의해 생성된 전자에 의해 H⁺가 환원되어 수소가 생성되는 반

응이 일어나지 않는다. 그러나 고등 식물로부터 분리한 광합성 기구에 H⁻ 환원반응을 유도할 수 있는 효소를 첨가하여 조류에서의 광수소 발생과 유사한 인공적인 시스템을 구성할 수 있다. Arnon 등(1961)은 시금치 엽록체에 박테리아로부터 분리한 hydrogenase를 조합하고 전자공여체로 시스테인을 사용하여 인공적인 광수소 발생계를 처음으로 구성하였는데, 그 후 이러한 원리를 이용하여 분리한 엽록체와 hydrogenase를 조합하거나(Fry *et al.*, 1977; Woodward *et al.*, 1988), hematoporphyrin(Okura and Thuan, 1980), ruthenium complex(Krasna, 1980), platinum complex(Kiwi and Grätzel, 1979; Richoux and Hall, 1980), flavin(Krasna, 1979) 등과 같은 물질을 photosensitizer로 이용하는 광수소 발생계에 대해 많은 연구가 진행되었다.

한편 Yagi(1976)는 전자공여계로 광합성 막을 사용할

본 연구는 1991년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI91-420)와 1991년도 한국과학재단목적기초(과제번호 91-0500-16) 연구비의 일부 지원에 의한 것임.

경우 초래되는 hydrogenase의 불활성화를 막기 위하여 전자공여체와 전자수용체를 격리한 hydrogenase/MV/Zn 전극 시스템을 이용하여 hydrogenase에 대한 전자공여체를 광합성 기구가 아닌 외부에서 가한 전기적 부하를 통하여 생물학적 수소 발생을 시험하였다. 또 Richoux와 Hall (1980)은 H⁺에 대한 전자전달 매개체로서 hydrogenase 대신에 백금을 사용하고 물 대신 여러가지 전자공여체를 조합한 광수소 발생계를 시험하였다.

그런데 고등 식물에서 분리한 엽록체를 이용하는 실험의 가장 큰 문제점은 생체로부터 분리한 엽록체의 기능적인 불안정성을 들 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 생체로부터 분리한 엽록체 혹은 크로마토포아 및 효소를 여러 가지 담체에 고정하는 방법이 시도되고 있는데(Gisby and Hall, 1980; Nosaka *et al.*, 1986; Hara *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1991c), 일부 연구자들이 polyvinylalcohol(PVA)에 엽록체를 고정한 후 전자전달계 활성의 안정성(Ochiai *et al.*, 1983; Park *et al.*, 1991a)과 엽록소 형광 유도 양상(Park *et al.*, 1991a; Wrobel *et al.*, 1991)에 대하여 보고하였으나 PVA에 고정된 엽록체와 백금 촉매를 조합한 수소 발생계에 대한 연구는 아직 보고되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 시금치 엽록체를 PVA에 고정한 후 백금 콜로이드 촉매와 조합하여 광에너지에 의한 생물학적 광수소 발생계를 구성하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

엽록체 추출. 엽록체는 시중 슈퍼마켓에서 구입한 시금치 잎 조직을 사용하여 Park과 Kwon(1986)의 방법에 따라서 분리하였다. 흐르는 물과 차게한 증류수로 시금치 잎을 세척하고 30분간 광을 조사한 다음 물기를 닦아낸 후 잎 무게의 3배 부피에 해당하는 TNS 완충액(50 mM Tris-HCl, 300 mM sucrose, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.25% BSA, pH 7.8)을 가하여 15초간 믹서로 마쇄하고 이 마쇄액을 광목으로 거른 다음 거른 용액을 3000g에서 1분간 원심분리하여 엽록체를 침전시켰다. 침전된 엽록체 소량의 TNS 완충액에 현탁하여 실험에 사용하였으며, 모든 추출과정은 0~4°C의 조건하에서 행하였다(Park *et al.*, 1991a).

엽록체의 고정. 15% PVA가 함유된 TNS 완충액(pH 7.8)에 엽록소량이 1 mg Chl/mL이 되도록 현탁하여 슬라이드 유리에 도말한 후 저온(4°C)의 암처에서 건조시켰다. 고정된 엽록체 필름을 일정한 크기(1 mm)로 잘라서 실험에 사용하였다(Park *et al.*, 1991a).

백금 콜로이드제조. 20 mL의 PVA 2% 용액에 10 mg의 platinum chloride를 녹인 후 0.1 N NaOH로 적정하여 pH 8.0이 되도록 하였다. 이 용액을 30분 동안 가열

하고 물을 첨가하여 40 mL이 되도록 한 다음 15분간 수소 가스를 통기시켜 백금 콜로이드를 제조하였다(Kiwi and Grätzel, 1979).

광합성 활성 측정. 분리된 엽록체의 광합성 활성은 150 µg의 엽록소량에 해당하는 엽록체를 2.4 mL의 HSN 완충액(50 mM HEPES-KOH, 5 mM NaCl, 0.1 M sorbitol, 0.5% BSA, pH 7.6)에 현탁한 후 Clark 형의 산소전극(YSI 53, Yellow Springs Inst., USA)을 사용하여 발생하는 산소의 양으로 측정하였다. 전자수용체로서 2 mM의 K-Ferri-cyanide(FeCy)를 사용하고 uncoupler로서 5 mM의 NH₄Cl을 첨가하였으며 광원은 할로겐 등을 사용하였고 광도는 오렌지 필터를 통과시킨 후 약 2000 µE·m⁻²·s⁻¹이 되도록 하였다(Park and Kwon, 1986).

수소 발생 및 정량. 12 mL 용량의 바이알에 2 mL의 백금 콜로이드 용액을 넣은 후 질소 가스로서 30분간 통기시킨 후 200 µg의 엽록소량에 해당하는 엽록체, 2 mM의 methyl viologen(MV), 200 unit of glucose oxidase, 100 µM의 glucose를 첨가하고 다시 10분간 질소 가스로서 통기시킨 후 광하에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 바이알 내의 기체 50 µL을 채취하여 Poropak Q column과 TCD 검출기가 장착된 가스 크로마토그래피(GC 14A, Shimadzu Co., Japan)로 수소 함량을 측정된 후 반응액에서 발생된 총수소량을 산출하였다(Park *et al.*, 1991b).

엽록소 정량. 80% 아세톤으로 엽록소를 추출하여 추출액의 흡광도를 측정하고(UV-240 spectrophotometer, Shimadzu Co., Japan), Arnon(1949)의 공식에 따라 엽록소량을 산출하였다.

결과 및 고찰

고정화 엽록체의 광합성 활성. 엽록체를 생체로부터 분리할 경우 광합성 전자전달 활성이 쉽게 상실될 뿐 아니라 연속적으로 강한 광을 조사하면 짧은 시간내에 전자전달계의 활성이 저하되는데 특히 광계 II는 광계 I에 비하여 신속하게 불활성화된다(Murata, 1971). 그러므로 엽록체를 이용하여 태양 에너지를 생물학적으로 전환시키는 연구에서 가장 큰 애로점은 엽록체의 저장에 대한 안정성과 반응의 지속성을 제고시키는 일이다. 본 연구에서는 광합성 기구를 이용한 광수소 발생계의 구성을 위하여 엽록체를 alginate, carrageenan, PVA 등에 고정된 후 광합성 전자전달 활성의 보존 정도를 비교한 결과 PVA에 고정된 경우 다른 담체에 비하여 매우 높은 전자전달 활성이 유지되는 것을 볼 수 있었는데 alginate에 고정된 경우 고정 직후에 유리 엽록체에 비하여 약 50%의 활성만 남아있으나 PVA에 고정된 경우는 그 활성이 100% 유지되었다(미발표 자료).

PVA에 고정된 엽록체를 상온과 저온에서 저장하면서

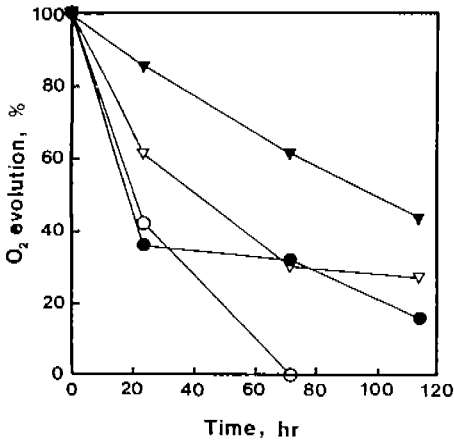


Fig. 1. Changes in photosynthetic oxygen evolution activity ($H_2O/FeCy+NH_4Cl$) of the free (open) and PVA-immobilized (closed) chloroplast during storage at 20°C (○) and 4°C (▽) (Park *et al.*, 1991a).

광합성 전자전달 활성을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 유리 엽록체는 20°C에 저장한 경우 약 40시간 이내에 전자전달 활성이 완전히 상실되었으나 PVA에 고정된 엽록체는 5일 후까지 약 20%의 전자전달 활성이 보존되었다. 그리고 유리 엽록체와 PVA에 고정된 엽록체를 4°C에 저장하여 활성을 측정된 결과 고정화된 엽록체는 5일 후까지 50%의 전자전달 활성을 유지하였으며 1개월 후에도 20%의 활성이 유지되는 것을 알 수 있었는데 이러한 결과는 Ochiai 등(1980)과 Park 등(1991a)의 결과와 일치하였다. 한편 Carpentier와 Lumieux(1987)은 glutaraldehyde을 이용한 광계 II 분획의 고정화실험에서 광계 II의 활성이 약 500시간까지 보존되는 것을 보고하였다. 그러나 글루타르알데히드로 고정할 경우 고정화 직후에 갖는 초기의 광합성 활성이 고정하기 전의 활성에 비해 40% 이하로 감소하는 문제점이 있는데 본 연구에서 PVA로 고정된 경우의 활성은 고정화 직후에는 고정화 전의 전자전달 활성이 거의 100% 활성이 유지되는 것을 볼 수 있어서 화학적인 결합을 통한 고정화 방법에 비하여 활성의 보존도가 높다는 것을 알 수 있다.

Ochiai 등(1978)은 sucrose, sorbitol 등과 같은 polyol 화합물이 엽록체 분리시 삼투압 조절제로서 작용할 뿐 아니라, 많은 효소의 기능을 안정화시킨다고 보고하고, PVA는 엽록체 광계에 대해 sucrose, sorbitol 등이 갖는 활성보호기능과 유사한 작용을 할 것이라고 주장하였는데 PVA는 전자전달 과정과는 달리 순환적 광인산화과정에는 큰 보호작용이 없다고 보고하였다.

한편 Mattiason과 Hahn-Hagerdal(1982)은 세포를 고정할 경우 물의 활동도(Water activity)의 감소가 초래되고

이것이 물의존적인(Water-dependent) 생화학 반응에 영향을 준다고 제안하였다. 또 Carpentier 등(1987)은 엽록체를 글루타르알데히드에 의한 cross-linking으로 고정할 경우 락타코이드의 엽록소 파괴와 광저해가 감소하는 것은 고정화 담체가 엽록체 막의 미세 점도를 증가시켜 산소 확산이 억제됨에 따라 엽록소의 광산화가 지연될 것이라고 주장하였다. 따라서 본 실험에서 고정화된 엽록체에서 광합성 활성의 안정성이 증가한 것은 Ochiai 등 (1978)이 제안한 polyol 화합물의 안정화 작용 외에도 PVA가 물의 활동도를 감소시켜 엽록체 막을 기능적으로 안정시키거나 혹은 PVA로 인하여 엽록체 막 주위의 미세 환경의 점도가 증가함으로써 산소의 접근을 감소시켜 엽록체의 구조적, 기능적 안정성을 증가시킬 가능성이 있다고 하겠다.

고정화 엽록체에 의한 광수소 발생. 최근 광합성 기능을 갖는 여러가지 조류세포를 이용하여 수소나 H_2O , NH_3 등과 같은 유용한 물질을 생산하는 시스템에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Hallenbaek, 1983; Asada *et al.*, 1985; Hall *et al.*, 1985; Park *et al.*, 1991b, c, d). 일반적으로 광수소 발생을 위한 시스템으로는 엽록체와 hydrogenase를 조합한 시스템과 엽록체와 여러가지 백금 화합물을 촉매로 사용한 시스템을 들 수 있다. 일반적으로 생체 촉매는 *in vitro* 하에서 쉽게 활성을 상실하는 성질과 재사용이 불가능하다는 문제점이 있지만 무기 촉매의 경우는 비교적 생리적 조건하에서는 촉매 기능이 안정적이며 회수하여 재사용할 수 있는 장점이 있다(Richoux and Hall, 1980). 따라서 백금 촉매는 hydrogenase와 유사하거나 또는 더 높은 수소 생성률을 가진 촉매체로서 hydrogenase를 대신할 수 있다.

엽록체와 무기 촉매를 이용한 광수소 발생 시스템의 가장 큰 장점은 광합성계에 의한 수소 발생이 광합성에 의한 빛의 광분할로부터 이루어질 수 있으며 이러한 시스템의 반응물은 물분자이며 최종 산물은 수소 분자와 산소 분자라는 점이다. 엽록체 혹은 인공적인 광수용체를 이용한 광수소 발생의 촉매로서 여러가지 백금 화합물이 사용될 수 있는데 특히 PVA-Pt 콜로이드가 PtO_2 등과 같은 여타의 백금 화합물에 비하여 매우 효과적인 촉매로 작용한다는 것이 보고되었다(Kiwi and Grätzel, 1979; Richoux and Hall, 1980).

Table 1은 고정된 엽록체의 저장 기간에 따른 광수소 발생 활성을 비교한 결과이다. 분리한 엽록체를 4°C 암조건하에서 1~6일간 저장한 후 광수소 발생능을 조사한 결과 초기 활성의 81~17% 정도가 유지되었다. 그러나 15% PVA에 고정된 엽록체를 4°C에서 1~15일간 저장한 후 광수소 발생을 조사한 결과 저장 1일 후에는 86%의 수소 발생능을 보였고 저장 15일 후에도 44%의 광수소 발생능이 유지됨을 볼 수 있었다.

Table 1. Hydrogen production from PVA-immobilized and free chloroplast during storage at 4°C under dark

Day	H ₂ production, %	
	PVA-immobilized	Free
0	100	100
1	86	81
3	76	66
6	47	17
9	46	—
15	44	—

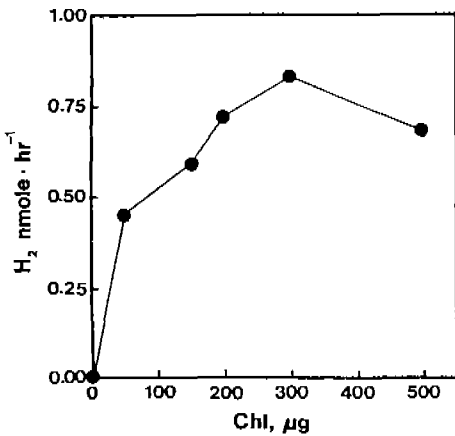


Fig. 2. Hydrogen production as a function of chlorophyll concentration in chloroplast/Pt system.

Fig. 2는 엽록체 양과 광수소 발생량을 비교한 결과인데 광수소 발생량은 반응액내의 엽록체 양이 증가함에 따라 일정한 수준까지 증가하였다. 엽록체의 양이 어느 수준 이상에서는 광수소 발생량이 더 이상 증가하지 않았는데 이것은 반응 용액의 탁도 증가에 따라 빛의 투과도가 감소된데 기인한다고 사료된다.

Fig. 3은 엽록체와 백금 콜로이드를 조합한 광수소 발생 반응계의 시간에 따른 수소 발생양을 조사한 결과이다. 유리 엽록체와 PVA에 고정된 엽록체에서의 수소 발생량을 비교한 결과 약 1시간 동안 지속적으로 수소가 발생하였으나 그 후 점차 발생률이 감소하였다. 이 경우 PVA에 고정된 엽록체는 고정화 과정이 하루가 걸리므로 결국 하루가 지난 엽록체의 활성과 분리한 직후의 유리 엽록체의 활성에 큰 차이가 없음을 보여주고 있다.

Fig. 4는 반응 용액에 첨가한 MV의 농도에 따른 광수소 발생을 측정된 결과로 수소 발생률은 2 mM MV 농도에서 최대로 나타났고 그 이상의 농도에서는 수소 발생이 감소하였다. 이와 같은 현상이 엽록체와 hydrogenase를 조합한

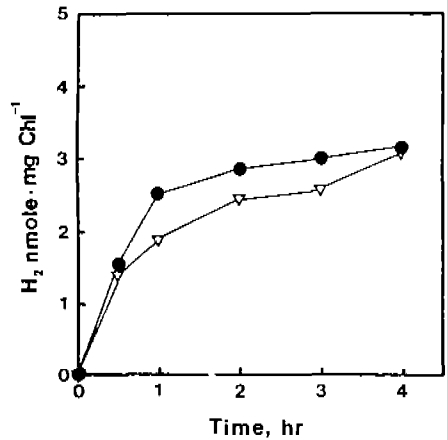


Fig. 3. Hydrogen production as a function of the time in chloroplast/Pt system. —●—, Free; —▽—, PVA-immobilized chloroplast.

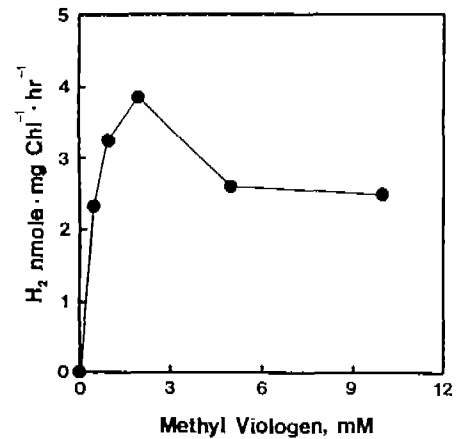


Fig. 4. Effect of methyl viologen concentration on hydrogen production in chloroplast/Pt system.

수소 발생 연구(Hoffmann *et al.*, 1977)에서도 나타났는데 그들은 이같은 현상의 원인으로 과도한 환원형의 MV가 광계 I의 인공적인 전자공여체를 재환원시키는 이유 때문이라고 추정하였다. 그러나 본 연구에서는 인공적인 전자공여체의 첨가가 없는 상태이므로 이것은 청색의 환원형 MV의 광흡수에 따른 빛가림 효과라고 생각될 수도 있겠다.

Fig. 5는 Chl/PVA/Pt 반응 용액에서 각 광도별 광수소 발생율을 측정된 결과이다. 116 µE · m⁻² · s⁻¹ 이상의 강광도에서 포화되었으며, 암상태에서는 수소가 발생되지 않는 것으로 보아 엽록체-백금 반응계에서의 수소 발생이 광의 준격이라는 것을 보여주고 있다.

Fig. 6은 여러 온도에서 수소 발생율을 비교한 결과인데

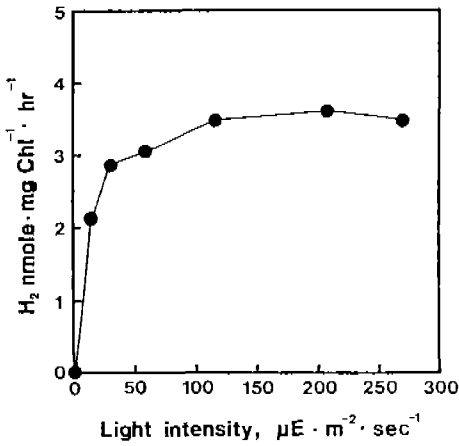


Fig. 5. Effect of light intensity on hydrogen production in chloroplast/ Pt system.

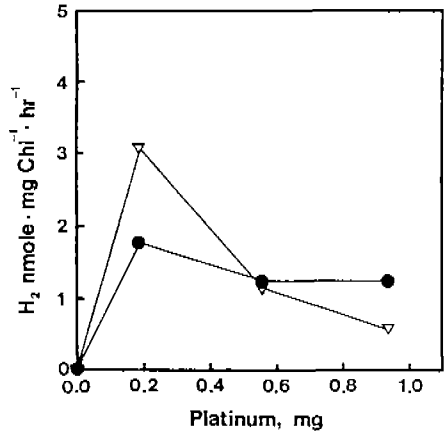


Fig. 7. Effect of platinum concentration on hydrogen production in reaction mixture. —●—, $90 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$; —▽—, $208 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

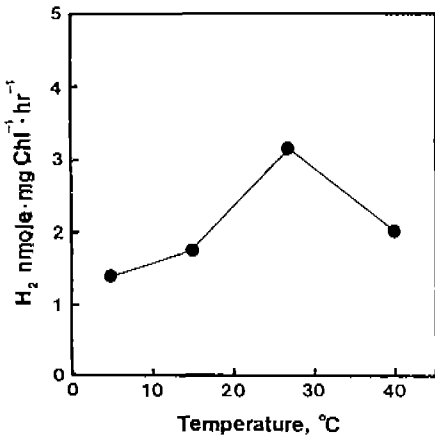


Fig. 6. Effect of temperature on hydrogen production in chloroplast/Pt system.

광수소 발생이 27°C에서 최대로 나타났으며 40°C에서 수소 발생이 급격히 감소되는데 이는 틸라코이드의 고온에 대한 불안정성에 기인되는 것 같다. Fig. 7은 백금 촉매의 농도에 따른 수소 발생률을 측정하여 반응 용액속에 0.19 mg Pt가 존재할 때 수소 발생률이 최대로 나타났으며 높은 농도의 백금 촉매 존재하에서는 광수소 발생이 오히려 감소하였는데 본 실험에서는 $208 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 의 광도와 0.94 μg Pt/ μg Chl 농도일 때 광수소 발생이 가장 높았다.

그리고 반응 용액내에 전자전달 저해제인 DCMU를 처리한 경우 광수소 발생이 억제되었는데 100 μM DCMU를 처리했을 때 43%의 수소 발생률을 보였다(Table 2). 이것으로 보아 광수소 발생이 광합성 전자전달계에 의존적임을 알 수 있다. 그러나 더 높은 농도의 DCMU에서도 광수소

Table 2. Effect of DCMU on the hydrogen production in the chloroplast/Pt system

DCMU, μM	H ₂ nmole/mg Chl/hr
0	3.73(100%)
100	1.61(43%)
200	1.52(41%)
500	1.24(33%)

발생이 완전한 저해되지 않는 것은 광수소 발생이 광계 I과 II간의 전자전달이 아니라 광계 I에 의존적일 가능성 (Boichenko *et al.*, 1985)과 아니면 PVA에 의한 점도의 증가로 인하여 DCMU의 확산이 방해될 가능성에 기인한다고 볼 수 있다.

이상의 실험에서 나온 결과들로 보아 PVA에 의한 엽록체의 고정 및 광합성 전자전달 활성과 광수소 발생 활성의 안정성을 증진시킨다는 것을 보여주고 있어서 엽록체를 이용한 광수소 발생계의 구성에 유용한 고정화 담체라 볼 수 있겠다.

적 요

PVA에 고정된 엽록체와 백금 촉매를 이용한 광수소 발생계를 구성하고 광합성 기구불 이용한 광수소 발생을 시험하였다. PVA에 엽록체를 고정된 경우 유리 엽록체에 비하여 저장 기간에 따른 광합성 활성과 광수소 발생 활성의 안정성이 크게 증가하였다. 분리한 엽록체를 6일간 저장한 후 광수소 발생 활성을 측정하여 결과 17%의 광수소 발생능을 보여주었으나 PVA에 엽록체를 고정된 경우 15

일간 저장한 후에도 44%의 광수소 발생능이 유지되었다. 광수소 발생 활성은 $116 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 이상의 광도와 온도 27°C 에서 최고의 수소 발생율을 보였으며, 염록체의 양에 따라 광수소 발생량도 증가하였다. DCMU를 처리하여 광합성 전자전달을 차단한 경우 광수소 발생이 감소하는 것으로 보아 광수소 발생이 광합성 전자전달계에 의존적이라는 것을 알 수 있었다. 이상의 실험결과로 보아 PVA가 광수소 발생체를 구성하기 위한 염록체 고정화에 좋은 담체라 사료된다.

참 고 문 헌

- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast, polyphenol oxides in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Arnon, D.I., A. Mitsui and A. Paneque. 1961. Photoproduction of hydrogen gas coupled with photosynthetic photophosphorylation. *Science* **134**: 1425.
- Asada, Y., N. Tomizuka and S. Kawamura. 1985. Prolonged hydrogen evolution by a cyanobacterium (blue-green algae), *Anabaena* sp. *J. Ferment. Technol.* **63**: 85-95.
- Boichenko, V.A., W. Wiessner, V.V. Klimov, D. Mende and S. Demeter. 1992. Hydrogen evolution indicates and increase in the antenna size of photosystem I in *Chlamydomonas stellata* during transition from autotrophic to photoheterotrophic nutrition. *Plant Physiol.* **100**: 518-524.
- Carpentier, R., R.M. Leblanc and M. Mimeault. 1987. Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilized thylakoid membranes. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 489-493.
- Francis, K. and H. Senger. 1985. Adaptation, readaptation and synthesis of hydrogenases in *Scenedesmus obliquus*. *Plant Cell Physiol.* **26**: 1195-1198.
- Fry, L., G. Papageorgiou, E. Tel-Or and L. Packer. 1977. Reconstitution of a system for H_2 evolution with chloroplasts, ferredoxin and hydrogenase. *Z. Naturforsch.* **32**: 110-117.
- Gaffron, H. and J. Rubin. 1942. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J. Gen. Physiol.* **26**: 219-240.
- Gisby, P.E. and D.O. Hall. 1980. Biophotolytic H_2 production using alginate-immobilized chloroplasts, enzymes and synthetic catalysts. *Nature* **287**: 251-253.
- Hall, D.O., D.A. Affolter, M. brouers, D.-J. Shi, L.-W. Yang and K.K. Rao, 1985. Photobiological production of fuels and chemicals by immobilized algae. *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **26**: 161-185.
- Hallenbeck, P.C. 1983. Immobilized microorganism for hydrogen and ammonia production. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 171-180.
- Hara, M., T. Majima, J. Miyake, S.I. Ajiki, H. Sugino, H. Toyotama and S. Kawamura. 1990. Oriented immobilization of bacterial photosynthetic membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 554-549.
- Hoffmann, D., R. Thauer and A. Trebst. 1977. Phoytosynthetic hydrogen evolution by spinach chloroplast coupled to a *Clostridium* hydrogenase. *Z. Naturforsch.* **32c**: 257-262.
- Kessler, E. 1974. Hydrogenase photoreduction and anaerobic growth. In, *Algal Physiology and Biochemistry*, W.D.P. Stewart (ed.). Blackwell, Oxford. pp. 456-473.
- Kiwi, J. and M. Grätzel. 1979. Protection, size factors and reaction dynamics of colloidal redox catalysts mediating light induced hydrogen evolution from water. *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 7214-7217.
- Krasna, I. 1979. Proflavin catalyzed photoproduction of hydrogen from organic compounds. *Photochem. Photobiol.* **29**: 311-314.
- Krasna, I. 1980. Acridines, deazoflavins and tris (2,2'-bipyridine) ruthenium as catalysts for photoproduction of hydrogen from organic compounds. *Photochem. Photobiol.* **31**: 75-82.
- Mattiason, B. and B. Hahn-Hagerdal. 1982. Microenvironmental effects on metabolic behavior of immobilized cells. A hypothesis. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 52-55.
- Murata, N. 1971. Effects of monovalent cations on light energy distribution between two pigment system of photosynthesis in isolated spinach chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta.* **226**: 422-432.
- Nosaka, Y., A. Kuwabara, T. Kobayashi and H. Miyama. 1986. Immobilization of hydrogenase in nylon gel containing electron mediator and application to an artificial photosystem. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 456-460.
- Ochiai, H., H. Shibata, T. Matsuo, K. Hashinokuchi and I. Inamura. 1978. Immobilization of chloroplast photosystems with polyvinylalcohols. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 683-685.
- Ochiai, H., H. Shibata, Y. Sawa and T. Katoh. 1980. "Living electrode" as a long-lived photoconverter for biophotolysis of water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 2442-2444.
- Ochiai, H., A. Tanaka and S. Fukui. 1983. Immobilized organelles. *Appl. Biochem. Bioeng.* **4**: 153-187.
- Okura, I. and N.K. Thuan. 1980. Kinetics and mechanism of methyl viologen reduction and hydrogen generation by visible light with hematoporphyrin catalysed by hydrogenase. *J.S.C. Faraday I.* **76**: 2209-2211.
- Park, I.H. and Y.M. Kwon. 1986. Effect of cupric sulfate on the chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts from chinese cabbage. *Kor. Biochem. J.* **19**: 207-212.
- Park, I.H., S.H. Seo, H.J. Lee, C.B. Lee and Y. Sunwoo. 1991

- a. Photosynthetic characteristics of polyvinylalcohol-immobilized spinach chloroplasts. *Kor. J. Bot.* **34**: 215-221.
- Park, I.H., K.K. Rao and D.O. Hall. 1991b. Photoproduction of hydrogen, hydrogen peroxide and ammonia using immobilized cyanobacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* **16**: 313-318.
- Park, I.H., K.K. Rao and D.O. Hall. 1991c. Photoproduction of hydrogen peroxide in free and foam-immobilized *Phormidium laminosum*. *Biochem. (Life Sci. Adv.)* **10**: 173-179.
- Park, I.H., C.H. Song, H.J. Lee, C.B. Lee and Y. Sunwoo. 1991d. Hydrogen production in polyvinyl-immobilized *Anabaena azollae* cells. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **6**: 181-187.
- Richoux, M.C. and D.O. Hall. 1980. Photoproduction of hydrogen activated by a colloidal platinum polyvinylalcohol catalyst. *Photobiochem. Photobiophys.* **1**: 375-383.
- Woodward, J., M. Reeves, D. Allison and E. Greenbaum. 1988. Effect of exogenously added manganese chloride on the operational stability of the chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 123-128.
- Wrobel, D., D. Nather, W. Hendrich and B. Roder. 1991. Polarized alcohol film. *Photosynthetica* **25**: 145-157.
- Yagi, T. 1976. Separation of hydrogenase-catalyzed hydrogen-evolution system from electron-donating system by means of enzymic electric cell technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2947-2049.

(1993. 8. 3 接受)