

Chlamydomonas reinhardtii 바이오매스를 이용한 생물학적 수소생산

김미선[†], 백진숙*, 김선창**

*바이오매스연구센터, 한국에너지기술연구원, 대전광역시 유성구 장동 71-2

**생명과학과, 한국과학기술원, 대전광역시 유성구 구성동 373-1

Biological hydrogen production using Chlamydomonas reindardtii biomass

Mi-Sun Kim[†], Jin-Sook Baek*, and Sun Chang Kim**

*Biomass research center, Korea Institute of Energy Research

**Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology

ABSTRACT

Chlamydomonas reinhardtii UTEX 90 was cultivated with continuous supply of 2% CO₂ using TAP media at 25°C and produced biomass 1.18 g of dry cell weight/L for 4 days. C. reinhardtii algal biomass(CAB) was concentrated to 20 times by volume and converted into hydrogen and organic acids by anaerobic fermentation using Clostridium butyricum. Organic acids in the fermentate of CAB were consecutively used to produce hydrogen by Rhodobacter sphaeroides KD 131 under the light condition. Approximately 52% of starch in the concentrated CAB which had 4-5.8, 24-26 and 6-7 g/L of starch, protein and fat, respectively was degraded by Cl. butyricum at 37°C. During this process, hydrogen and some organic acids, such as formate, acetate, propionate, and butyrate, respectively were produced. Further conversion of the organic acids in anaerobic fermentate of CAB by Rb. sphaeroides KD131 produced hydrogen from the anaerobic fermentate under the illumination of 8 klux using halogen lamp at 30°C. The result showed that hydrogen was evolved by the anaerobic conversion using Cl. butyricum and then by the photosynthetic fermentation using Rb. sphaeroides KD131. It indicated that the two-step conversion process produced the maximum amount of hydrogen from algal biomass which contained carbohydrate, protein, and fat via organic acids.

주요기술용어 : Chlamydomonas reinhardtii, C. reinhardtii algal biomass (CAB), Clostridium butyricum, Rhodobacter sphaeroides, hydrogen (수소)

† Corresponding author : bmmskim@kier.re.kr

수소에너지는 지구환경 문제와 고갈되는 화석 에너지의 필요량을 대체할 수 있는 신재생 에너지로 가장 촉망받는 에너지이다. 현재 알려진 수소생산 기술은 다양하며, 각 기술의 개발 단계도 많은 차이가 있다. 즉, 화석연료의 수증기 개질반응은 이미 상용화 수준에 도달한 반면 일부기술은 아직 기초연구에 머무르고 있다. 그러나 화석연료의 부존성 및 편재성에 의한 국가간 긴장과 지구환경 오염 등의 심각한 문제 때문에 장차 궁극적인 수소제조 기술은 태양광, 수력, 풍력, 미생물과 같은 청정기술을 이용하여 물이나 폐자원을 활용하는 환경 친화적인 기술로 수소를 제조해야 할 것으로 전망하고 있다.

조류는 광합성 조건에서 이산화탄소를 고정하여 세포 내 전분과 각종 고분자 물질을 축적하지만, 빛이 없는 암 조건에서는 전분을 분해하는 메카니즘을 갖는다¹⁾. 이러한 조류의 이산화탄소 고정은 장기적인 화석연료 사용으로 인한 지구온난화의 원인이 되는 이산화탄소를 제거, 저감하는 기술로써 환경 친화적이고 환경문제의 심각성을 완화 할 수 있는 기술로 주목을 받고 있다. 또한 그 자체가 바이오매스로 축적되어 조류 바이오매스를 자원화 할 수 있는 기술이다.

조류 바이오매스에 의한 수소생산 기술에는 현재까지 여러 방법이 검토되고 있으며, 녹조류의 광합성계에 의한 물의 직접 광분해로부터 수소 및 산소를 생성하는 것이 가장 이상적이며 기본적인 수소생산법이다. 그러나 광합성으로부터 생성된 산소는 수소생산에 주요한 역할을 하는 효소인 hydrogenase를 저해하여 수소생산에 주요한 장애물이 되고 있다. 여러 가지 대안으로 간접광분해 기술이 제안되고 있고²⁻⁴⁾ 실제로 수소생산을 위해 개발되고 있다¹⁾. 주요 장점은 지구온난화 가스인 이산화탄소를 고정하여 조류라는 매체로 저장하고 이로부터 분리된 균체를 이용하거나 산소와의 접촉을 피하고자 분리된 발효단계로부터 수소를 생산한다는 것이다. 그러나 간편함과 비용절감의 측면에서 여러 단계가 포함된 간접수소생산 기술은 여전히 광효율 증대 및 유기물로부터 수

소생산 속도의 증대가 더욱 요구되고 있다.

조류 바이오매스에 축적된 고분자 유기물은 혐기 세균과 광합성 세균이 이를 직접 이용하여 수소를 생산하는 과정은 효율이 낮기 때문에 효율적으로 수소로 생산하기 위해서는 전분과 같은 고분자 유기 물질을 전처리 과정을 통하여 저분자의 탄수화물이나 유기산으로 전환할 필요가 있다. 현재까지 전처리 과정으로 조류의 혐기발효, 강산을 첨가한 열처리, 및 젖산발효를 통한 전분의 젖산으로의 전환 등이 연구되어 왔다^{1,4,5)}. 본 연구에서는 조류바이오매스를 이용한 다단계 수소생산 공정으로 첫 번째 조류의 광합성에 의해 이산화탄소를 고정화하여 전분 및 고분자 물질을 세포 내에 축적하고, 두 번째 *Clostridium butyricum* NCIB 9576의 조류바이오매스 혐기발효로 수소와 유기산을 생산하고, 마지막 단계로 *Rhodobacter sphaeroides* KD131에 의해 유기산을 수소로 전환하는 공정으로 이루어졌다.

2. 재료 및 방법

2.1 조류바이오매스 생산

Chlamydomonas reinhardtii UTEX 90은 20 mM Tris base, 1 mM phosphate buffer, 7.5 mM NH₄Cl, 0.4mM MgSO₄·7H₂O, 0.34mM CaCl₂·2H₂O를 함유한 최소배지인 TAP 배지에 배양하였다. 탄소원으로 20mM glycolic acetate를 추가하였고 2% CO₂를 함유한 공기를 연속적으로 주입하였다. 배지는 또한 다음의 미량원소를 함유한다. 0.186mM BO₃H₃, 0.077mM ZnSO₄·7H₂O, 0.026mM MnCl₂·4H₂O, 0.018mM FeSO₄·7H₂O, 0.006mM CoCl₂·6H₂O, 0.006mM CuSO₄·7H₂O, 및 0.89mM ammonium molybdate. 광원으로 형광등을 사용하여 200 μE/m²s을 조사하며 25°C에서 5일간 배양하였다.

C. reinhardtii 종배양액을 100L 수직평판형 광생물반응기 (1×1×0.1 m, length×height×depth)에 5% (v/v) 접종하여 25-28°C에서 본배양하였다 (Fig. 1). 배양액은 대전광역시에서 2003년 5월에

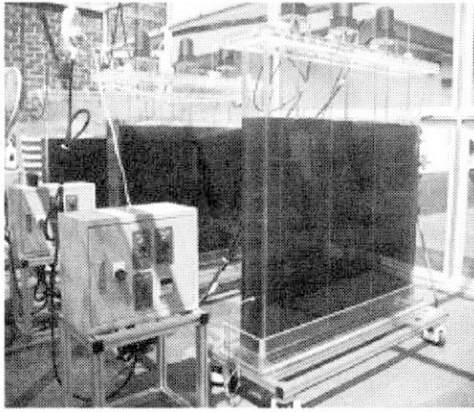


Fig. 1 Outdoor equipment for cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass

서 7월까지 옥외배양 하였으며 교반기를 이용한 배양액의 혼합으로 균체에 균일하게 광을 조사되게 하였다. 조류 균체는 원심분리 (6,000g, 15분)로 18-20배 농축하였다. 대상(주)에서 구입한 시판용 클로렐라 분말을 증류수에 5%(w/v)이 되도록 현탁하여 대조구로 사용하였다.

2.2 조류바이오매스의 혐기발효

혐기세균인 *Clostridium butyricum* NCIB 9576은 PYG 배지에 20 ml 규모로 종배양하여 지수성장기에 원심분리로 균체를 회수한 후 0.085% saline solution으로 씻어내어 준비하였다⁶⁾. 150 ml serum bottle에 준비된 *Cl. butyricum*을 100 ml의 농축 조류바이오매스에 접종하여 37°C에서 혐기배양하였다.

2.3 조류바이오매스 혐기배양액을 이용한 광합성 발효

조류바이오매스의 혐기발효액을 원심분리하여 얻어진 상등액은 butyrate 농도가 80-90 mM이 되도록 8 mM glutamate와 0.1% K₂HPO₄를 첨가한 GL 최소배지를 사용하여 희석하였고 이를 광발효 배지로 사용하였다⁷⁾. 20 ml의 *Rb. sphaeroides* KD131 활성균주를 원심분리로 회수

하여 준비된 조류바이오매스 발효액에 접종하였다. 유리병에 고무와 알루미늄 마개로 밀봉하고 Ar 가스로 치환하여 산소를 제거한 후 8 klux의 할로겐등으로 조사하며 30°C에서 배양하였다.

2.4 분석

배양 용기 내 수소가스 함량은 gas chromatography (GC 14-B, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 molecular sieve 5A column과 TCA detector로 분석하였다. 유기산은 HPLC (SCL-10A VP, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 Aminex HPX-87H organic acid analysis column (Biorad, Hercules, USA)로 분석하였다.

3. 결과

3.1 조류바이오매스 생산

활성화된 *Chlamydomonas reinhardtii* 종배양액을 TAP 배지에 5%(v/v) 접종 후 2% CO₂ 함유한 공기를 200ml/min 유속으로 공급하여 형광등 200 μE/m²s 하에서 키운 결과 doubling time은 15 시간이었다(Fig. 2). 초기 균체농도는 0.13 (흡광도 660nm)에서 배양 96시간 이후 최대 균체농도 2.27을 나타내었으며, 건조세포질량은 초기 0.13 g dcw/L였고, 96시간 배양 후 1.18g dcw/L로 최대를 나타내었다.

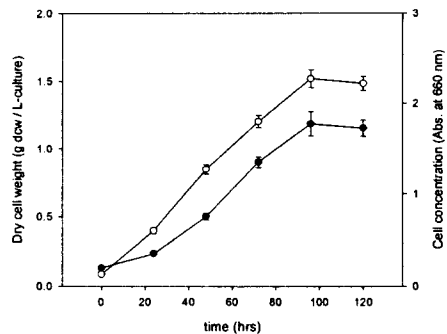


Fig. 2. Growth curve of *C. reinhardtii* UTEX 90 supplemented by 20 mM acetate and 2% CO₂.

○, cell concentration (660nm); ●, dry cell weight

Table 1. Composition of *C. reinhardtii* biomass

	조류 바이오매스		시판 클로렐라
	농축 전	농축 후	현탁액
pH (g/L)	5.9-6.1	6.0-6.2	6.9-7.0
세포건조중량 (g/L)	1.45	12-18	<35
전분 (g/L)	0.77	4.0-5.8	10
단백질 (g/L)	N.D	24-26	31
지방 (g/L)	N.D	6-7	5

조류바이오매스의 대량생산을 위하여 형광등 하에서 자란 균체를 종균으로 하여 100 L 규모 수직평판형 배양기에서 옥외배양하였다. 그 결과 배양액 중 *C. reinhardtii* 바이오매스는 건조세포중량 1.45g dcw/L 이었고, 이를 18-20배 농축하여 건조중량 12-18g dcw/L으로 준비하였다. 이 때 *C. reinhardtii* 바이오매스의 성분을 분석한 결과 주로 전분, 단백질, 및 지방으로 구성되어 있으며 각각의 농도는 4-6, 24-26, 및 6-7g/L 이었다 (Table 1). 조류바이오매스로부터의 수소생산 대조구로 사용된 시판용 클로렐라 분말은 증류수에 현탁하여 사용하였고 이의 성분을 분석한 결과 전분, 단백질, 및 지방의 농도는 각각 10, 3, 및 5g/L 이었다 (Table 1).

3.2 조류바이오매스의 혐기발효

Clostridium butyricum NCIB 9576을 이용하여 *C. reinhardtii* 조류바이오매스 농축액, 시판용 클

로렐라 현탁액 및 전분 배지를 절대혐기 조건에서 발효하였다. 그 결과 두 가지 종류의 조류바이오매스 (실험2, 3)를 사용한 경우와 starch 배지 (실험1)를 사용한 경우 모두 수소와 유기산이 생성되었고 이를 Table 2에 나타내었다.

동일한 전분 분해율에서 비교할 때, 실험 1에서는 실험2와 3에서보다 더 많은 양의 수소가 생산되었다. *C. reinhardtii* 바이오매스는 전분, 단백질 및 지방함량이 각각 5, 25, 및 6g/L였고 이를 *Cl. butyricum*으로 37에서 48시간동안 혐기 발효한 결과 52% starch, 10-20% 단백질 및 지방이 분해되었다. 이 과정에서 37.1 mmol H₂/L-조류바이오매스의 수소가 생성되었고, 유기산으로 formate, acetate, propionate 및 butyrate가 각각 13.6, 25.5, 7.4 및 493 mM 생성되었다. 혐기발효 중 생산된 여러 저분자 유기산 중에서 실험1의 경우에는 acetate가 주산물인 반면 실험2와 3에서는 butyrate가 주산물이었다. 또한 혐기발효 중의

Table 2. Hydrogen and organic acid production by *Cl. butyricum* NCIB 9576 using algal biomasses

구분	starch 분해율 (%)	pH	수소생산량 (ml-수소/ml-배양액)	유기산 (mM)				
				formate	acetate	propionate	butyrate	
1	1% starch ⁽¹⁾	80.0	4.53	2.10	5.0	55.5	13.0	30.0
2	<i>Chlamydomonas</i> ⁽¹⁾	52.0	6.70	0.83	13.6	25.5	7.4	493.0
3	<i>Chlorella</i> ⁽¹⁾	22.5	6.40	0.21	9.37	7.89	-	33.3
	<i>Chlorella</i> ⁽²⁾	81.4	4.88	0.93	7.9	5.7	5.6	84.5

각각의 배양액은 37°C에서 48시간⁽¹⁾ 및 96시간⁽²⁾ 동안 혐기적으로 배양되었다.

pH 변화 또한 전분 배지와 조류바이오매스 사이에 큰 차이를 보였다.

조류바이오매스가 함유한 starch는 매우 천천히 분해되어 24시간동안 23-52% 분해되었고 pH 또한 6.4-6.7로 약간의 감소만을 보여 발효는 계속 진행된 반면, PY 인공배지에 함유된 전분은 24시간 배양 후 80% 분해되었고 그 결과 acetate가 주로 생산되어 그 결과 pH 4.5로 떨어져 더 이상의 발효가 진행되지 않았다.

3.3 *Rb. sphaeroides* KD131의 광합성발효에 의한 수소생산

광합성 세균 중 홍색 비유황 또는 유황 세균은 photo-heterotrophic 조건에서 높은 효율로 수소를 생산한다. 특히 *Rhodobacter* 속은 다양한 유기산을 이용하여 수소생산을 하는 것으로 이에 대해 이미 많은 연구가 이루어지고 있다. 최근 자연계로부터 분리된 홍색비유황세균인 *Rb. sphaeroides* KD131의 수소생산 연구를 수행하였다⁸⁾. 다양한 유기산 중에서 acetate, lactate, malate 및 butyrate를 탄소원으로하여 *Rb. sphaeroides* KD131의 균체 성장과 수소생산을 비교하였다 (Table 3). 48시간 동안의 광합성 발효한 결과 malate의 경우 96%의 분해율을 보인 반면, butyrate는 40%, lactate와 acetate의 경우에는 73-74%의 분해율을 보였다. 이 균주에 의한 수소생산은 lactate가 가장 우수하였으며, malate도 다른 유기산에 비해서 높은 수소생산량을 보였다. *Rb. sphaeroides* KD131는 acetate를 이용하여

높은 균체성장을 보였으나 수소생산량은 적었다. 이와 같은 결과는 lactate나 malate등의 유기산을 이용한 경우 발효액의 pH는 7.4-7.9를 나타낸 반면, acetate가 기질로 쓰일 때는 배양액의 pH가 8.5-8.7로 증가하였기 때문인 것으로 분석되지만, 이러한 pH의 상승은 cell membrane potential을 고갈시키고, 결과적으로 PHB를 축적한다고 보고되었다. 기질 분해율로 비교하였을 때 lactate와 acetate의 경우 동일한 분해율을 나타내었으나 수소생산량은 lactate를 이용한 경우 거의 2 배 높은 값을 보였다. 또한 acetate를 사용한 경우 배양 후 pH가 8.5-8.7로 상승되었는데 이는 acetate로부터 유래한 부산물이 *Rb. sphaeroides* KD131의 광발효 과정에서 배양액에 축적된 결과로 보인다. 이러한 acetate와 lactate를 탄소원으로 이용하였을 때 *Rb. sphaeroides* KD131의 pH 변화 및 수소생산에 상이한 결과를 96시간동안 관찰하였다 (Fig. 3). Acetate는 lactate를 이용한 경우보다 빠른 균체성장을 보인 반면 수소생산성에 있어서는 lactate의 경우 5.1 ml 수소/ml-배양액 으로 acetate 경우의 4.1 ml 수소/ml-배양액 보다 높은 수소생산성을 보였다. Butyrate는 48시간에 약 40%만이 분해되었지만, 예비 실험 결과에 의하면 첨가한 양의 90% 이상이 분해되려면 200시간 이상 소요되었다. 이러한 기질 분해 속도가 느린 이유는 잘 밝혀지지 않았지만, 단위 기질농도 당 수소생산량은 다른 유기산에 비해서 높은 것으로 분석된다.

Butyrate는 조류바이오매스 발효액 중에 가장 많은 양을 차지하는 유기산으로 이의 배양시간별

Table 3. Hydrogen production of *Rb. sphaeroides* KD131 using various organic acids

유기산	pH	균체농도 (Abs. at 660nm)	수소생산량 (ml H ₂ /ml broth)	유기산 분해율 (%)
lactate	7.79-7.87	3.41-3.96	2.79-2.94	73.7
acetate	8.46-8.74	3.77-4.15	1.28-1.43	72.9
malate	7.35-7.49	2.21-2.62	2.41	95.9
butyrate	7.50-7.60	3.50-3.61	1.94	40.3

유기산의 농도는 GL 배지에 30 mM로 조정되었다. 잘 자란 *Rb. sphaeroides* KD131 종배양액은 660 nm에서 흡광도 0.2 가 되도록 접종되어 30℃ 에서, 8 klux 할로겐등을 조사하며 48시간 동안 배양하였다.

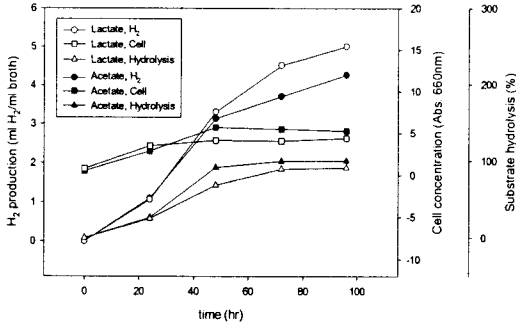


Fig. 3. Hydrogen production and cell growth of *Rhodobacter sphaeroides* KD131 using 50mM acetate and lactate. ○, lactate H₂ production; □, lactate cell growth; △, lactate hydrolysis; ●, acetate H₂ production; ■, acetate cell growth; ▲, acetate hydrolysis

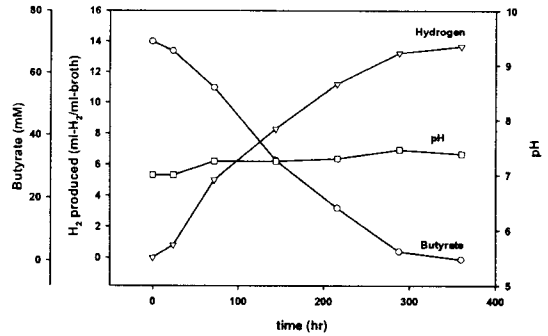


Fig. 4. Hydrogen production by photofermentation of *Rb. sphaeroides* KD131 using 70mM butyrate

분해율과 수소생산은 매우 흥미로웠다(Fig. 4). 더욱이 butyrate의 수소로의 전환율은 1 mol butyrate로부터 생산될 수 있는 이론적 수소양인 8 mol의 약 90%이었으며 이는 다른 유기산보다 가장 높은 값이었다. 그림 1에서 보인바와 같이 초기 pH 7.0은 발효과정에서 7.3-7.5로 증가하였고, butyrate는 360시간의 광발효로 완전히 분해되었으며 이후에도 수소는 계속 생산되었다.

C. reinhardtii 바이오매스 발효액은 15mM formate, 21mM acetate, 4mM propionate 및 520mM butyrate의 유기산 조성을 보였고 이를 2, 4, 8배 희석하여 *Rb. sphaeroides* KD131 광발

효의 탄소원으로 사용하였다. 희석된 발효액은 *Rb. sphaeroides* KD131에 의해 96-192 시간 동안 광발효 되었고 이때 유리병의 한쪽 면에 할로겐램프를 8 klux 로 비추어주었고, 하루에 두 번 흔들어주며 30℃에서 배양하였다.

그 결과 Table 4에 보인바와 같이 8배 희석한 발효액에서 butyrate가 각각 37% 및 50% 분해되었을 때 165 mM 및 357 mM의 수소가 생성되었다. 74 mM butyrate 함유 발효액이 균체생장 및 수소생산량이 높은 반면, 144 mM 및 285 mM butyrate 함유 발효액에서는 균체의 생장이 저해되었다.

4. 고찰

담수 녹조류인 *C. reinhardtii*는 CO₂ 만을 탄소

Table 4. Hydrogen production by photofermentation of *Rb. sphaeroides* KD131 using anaerobic fermentate of *C. reinhardtii* biomass

혐기발효액 희석배수	최종 pH	균체 농도 (Abs. 660nm)	수소 생산량 (ml-H ₂ /ml- broth)	유기산 농도 (mM)					
				광발효 전			광발효 후		
				formate	acetate	butyrate	formate	acetate	butyrate
2	8.87	2.54	1.24	90.0	10.8	285.1	95.0	0	274.9
4	7.61	4.10	2.89	46.5	5.25	144.0	47.8	1.8	121.5
8	7.43	4.18	3.71	19.0	3.2	73.8	26.7	1.2	46.3
8 ¹	7.41	4.50	8.00	19.0	3.2	73.8	30.0	1.0	36.9

균체는 8 mM sodium glutamate 및 1 mM K₂HPO₄를 함유한 GL 배지에 희석된 혐기발효액을 할로겐등 8 klux 하에서 96시간 및 192시간 동안 배양되었다.

원으로 주입하는 photo-autotrophic 배양을 할 경우 성장속도가 느리지만, 20 mM acetate를 탄소 원으로 추가로 첨가할 경우 기존에 보고된 것 보다 높은 성장속도를 보였다⁹⁾. *C. reinhardtii*와 같은 조류는 광합성 배양 중에 직접적으로 수소생산을 할 수 없고, 조류 바이오매스를 충분히 확보한 후에 균체를 어둠에서 적응시켜 발효에 적합한 효소를 유도한 후에 수소를 생산할 수 있다. 또한 균체를 혐기적으로 황 결핍 조건에서 배양한 후 수소생산도 시도되고 있다¹⁰⁾. 반면에 조류 바이오매스가 성장 중 세포 내에 축적한 전분, 단백질 및 지방을 전 처리 과정을 통하여 저분자의 유기산으로 전환할 경우 홍색비유황세균을 이용하여 높은 수율로 수소를 생산할 수 있다^{9,11)}. Ike 등은 조류바이오매스를 강산으로 전 처리하여 *Rb. sphaeroides* RV를 이용하여 수소생산 시도를 하였으나 바이오매스로부터의 유기산 전환량이 적어 많은 양의 수소를 생산할 수 없었다⁵⁾. Ike 등은 또한 이 후의 연구에서 조류바이오매스를 먼저 젖산 발효하여 젖산으로 전환한 후 이를 이용하여 *Rhodobium marinum*에 의해 수소를 생산한 바 있다⁴⁾. 본 연구에서는 *C. reinhardtii* 조류바이오매스를 *Cl. butyricum*을 이용하여 혐기발효함으로써 수소를 생산함과 동시에 각각 13.6, 25.5, 7.4 및 493 mM 의 formate, acetate, propionate, 및 butyrate의 유기산으로 전환할 수 있었고 이를 이용한 *Rb. sphaeroides* KD131의 광발효에 의해 최종적으로 조류바이오매스의 1 mol starch-glucose 당 8.3 mol 수소를 생산하였다. 조류바이오매스와 대조군인 1% starch 인공배지의 혐기발효액은 유기산 조성 중에서 특히 butyric acid의 함량에서 큰 차이를 보였다. 조류바이오매스의 혐기발효액이 함유하는 높은 농도의 butyrate는 조류바이오매스의 자체가 함유한 높은 농도의 단백질과 지방 함량과 관계 있다고 사료된다. 이미 알려진 *Cl. butyricum*의 대사과정¹²⁾에서 starch는 glucose로 가수분해 되며 glucose는 다시 acetyl-CoA를 거쳐 butyrate로 분해된다. 또한 대부분의 아미노산 (alanine, glycine, serine,

cystein, tryptophan, lysine, phenylalanine, tyrosine, leucine, 및 isoleucine) 또한 acetyl-CoA를 거쳐 butyrate가 축적되는 경로로 진행될 수 있다. *Cl. butyricum* 배양액 중에 존재한다고 알려져 있는 여러 가지 lipase 또한 지방을 분해하여 butyrate의 축적에 간접적 기여를 할 것으로 사료된다. 단백질과 지방의 혐기대사과정은 현재까지 알려진 바 없어 앞으로 단백질과 지방의 분해와 그 대사산물의 분석 및 동정 연구가 필요하다고 사료된다.

조류바이오매스의 *Cl. butyricum*을 이용한 혐기발효는 *Enterobacter sp.*¹³⁾ 등의 타균주의 혐기발효보다 높은 수소 생성율을 보였고 이를 이용한 *Rb. sphaeroides* KD131의 광발효 시 butyrate가 풍부한 조류바이오매스 발효액이 다른 유기산보다 수소생산에 효과적이었다.

후 기

이 논문은 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어 연구개발사업 (수소에너지사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) T. Akano, Y. Miura, K. Fusatsu, H. Miyasaka, Y. Ikuta, H. Masumoto, A. Hamasaki, N. Shioji, T. Mizoguchi, K. Yagi, and I. Maeda: "Hydrogen production by photosynthetic microorganisms", *Appl. Biochem Biotechnol.*, Vol. 57/58, 1996, pp. 677-688.
- 2) S. Kosourov, M. Seibert, and M. L. Ghirardi: "Effects of Extracellular pH on the Metabolic Pathways in Sulfur-Deprived, H₂-Producing *Chlamydomonas reinhardtii* Cultures", *Plant Cell Physiol.*, Vol. 44, No. 2, 2003, pp.146-155.
- 3) N. M. Weare and J. R. Benemann: "Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*: I.

- Localization of nitrogen fixation in heterocysts", *Arch. Mikrobiol.*, Vol. 90, 1973, pp. 323-332.
- 4) A. Ike, N. Toda, N. Tsujii, K. Hirata, and K. Miyamoto: "Hydrogen photoproduction from CO₂-fixing microalgal biomass: application of halotolerant photosynthetic bacteria", *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 84, 1997, pp.606-609.
 - 5) A. Ike, C. Saimura, K. Hirata, and K. Miyamoto: "Environmentally friendly production of H₂ incorporating microalgal CO₂ fixation", *J. Mar. Biotechnol.*, Vol. 4, 1996, pp. 47-51.
 - 6) J.J. Molongoski, and M.J. Klug: "Characterization of anaerobic heterotrophic bacteria isolated from freshwater lake sediments", *Appl. Env. Microbiol.*, Vol. 31, 1976, pp.83-90.
 - 7) X.Y. Mao, J. Miyake, and S. Kawamura: "Screening photosynthetic bacteria for hydrogen production from organic acids", *J. Ferment. Technol.*, Vol. 64, 1986, pp. 245-249.
 - 8) I.H. Lee, J.Y. Park, D.H. Kho, Kim, M.S., and J. K. Lee: "Reductive effect of H₂ uptake and poly-hydroxybutyrate formate on nitrogenase-mediated H₂ accumulation of *Rhodobacter sphaeroides* according to light intensity", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 60, 2002, pp. 147-153.
 - 9) A. Ike, T. Murakawa, H. Kawaguchi, K. Hirata, and K. Miyamoto: "Photoproduction hydrogen from row starch using a halophilic bacterial community", *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 88, 1999, pp. 72-77.
 - 10) M.L. Ghirardi, L. Zhang, J.W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum, and A. Melis: "Microalgae: a green source of renewable H₂", *Trends in Biotechnology*, Vol. 18, 2000, pp. 506-511.
 - 11) M.S. Kim, J.H. Ahn, J.S. Baek, J.K. Lee, G.H. Aoh: "Effect of carbon sources on photo-biological hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* mutant strain", *Proceedings of 6th International Conference on New Energy Systems and Conversions*. Nov 9-13. Busan, Korea. 2003, pp. 28-33.
 - 12) Saint-Amans, S. L. Girbal, J. Andrade, K. Ahrens, P. Soucaille: "Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures", *J. Bacteriology*, Vol. 183, No. 5, pp. 1748-1754.
 - 13) S. Tanisho, and Y. Ishiwata: "Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*", *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 19, No. 10, 1994, pp. 807-812.