

## Rhodobacter sphaeroides의 수소생산에 미치는 광세기 및 광합성 배양기 영향

김미선<sup>†</sup>, 백진숙

바이오메스연구센터, 한국에너지기술연구원, 대전시 유성구 장동 71-2

## Influence of light intensity and photo-bioreactor design for photo-biological hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides

Mi-Sun Kim<sup>†</sup>, Jin-Sook Baek

Biomass research center, Korea Institute of Energy Research, 71-2, Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea

### ABSTRACT

Purple non-sulfur bacteria, Rhodobacter sphaeroides KD131 grew to reach the maximum cell concentration in 45 hrs of incubation in the synthetic media containing (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, L-aspartic acid and succinic acid as the carbon and nitrogen sources, respectively, at 30°C under 8 klux irradiance using halogen lamp. The strain produced hydrogen from the middle of the logarithmic growth phase and continued until the cell growth leveled out. The strain grew and produced hydrogen under the irradiance of 3-30 klux, but cell growth was inhibited over 100 klux. In addition, anaerobic/light culture condition was better than the aerobic/dark on the hydrogen production. Among various photo-bioreactors examined, the flat-vertical reactor manufactured using clear acrylic plastic material showed the best hydrogen production rate at the given culture condition.

**주요기술용어** : Photosynthetic bacteria(광합성세균), *Rhodobacter sphaeroides* KD131, hydrogen(수소), photo-bioreactor(광합성발효기), light intensity(광세기)

### 1. 서론

<sup>†</sup> Corresponding author: bnmmskim@kier.re.kr

미생물이 갖는 수소생산 기작은 광원의 유무에 따라 수소생산 발생경로가 다를 뿐만 아니라, 기질의 종류 및 미생물 고유의 효소계에 의해 수소생산 기작이 달라진다. 수소를 생산하는 미생물은

크게 광합성 세균 (photosynthetic bacteria)<sup>1)</sup>, 혐기성세균(non-photosynthetic anaerobic bacteria)<sup>2)</sup>, 조류 (algae)<sup>3)</sup> 등으로 구분되고, 이들의 수소 생성 기작, 이용가능 기질 및 수소 발생량은 상당한 차이가 있다. 광합성세균은 Rhodospirillaceae, Chromatiaceae 및 Chlorobiaceae로 구분되며, 이는 각각 홍색비유황세균 (purple non-sulfur bacteria), 홍색유황세균 (purple sulfur bacteria), 녹색유황세균 (green sulfur bacteria)으로 통칭된다.

홍색비유황세균은 다양한 유기물로부터 수소를 발생시킬 수 있는 광합성 세균으로 이중에서도 Rhodopseudomonas 속의 광합성 세균은 자체의 bacterio-chlorophyll (BChl)이 장파장의 빛을 받아 전자전달 기작에 의해 질소 고정화를 한다. 질소고정화에 관여하는 최종 효소는 nitrogenase이며,  $N_2$ ,  $NH_3$ ,  $NH_4^+$  등 질소원이 존재하지 않을 때  $H^+$ 을 수소로 환원하여 수소가스를 발생한다<sup>4)</sup>. 이 세균은 수소생산 효소인 hydrogenase 보다는 질소 고정효소인 nitrogenase 환원에 의해 광합성 메카니즘과 유기물이나 환원 황 화합물, 분자상의 수소로부터 온 양성자( $H^+$ )와 전자( $e^-$ )로부터 수소를 생산한다. 이 과정에 의한 수소생산은 혐기 상태, 적절한 광합성 조건, 제한된 질소원 공급, 효율적인 기질 공급으로 최대 수소생산율을 나타낸다.

광합성 세균은 조류 및 식물이 광합성계 (photosystem, PS) I과 II를 모두 광합성에 이용하는 것과는 달리 PS I만을 이용하여 광합성과 수소생산을 한다. 즉 PS I에 cytochrome-associated photoreaction pigment 복합체인 reaction center라고 불리는 것을 가지고 있다. 이 reaction center의 역할은 빛 에너지를 BChl과 carotenoid 등의 색소로 흡수하며 reaction center 복합체의 양면의 전위차로 전환하고, 이러한 전위차는 cyclic 전자 전달계를 생기게 하고, 이것은 다시 ATP등의 고 에너지 화합물을 만들게 된다. 이때 기질이 공급하는 전자가 nitrogenase 효소계의 전자 전달체 (ferredoxin)를 환원하며, 이 환원

력과 ATP를 이용하여 nitrogenase가 질소원이 없는 조건에서 분자 상의 수소를 발생한다. 이러한 광합성 세균으로부터 생산되는 생물학적 수소로의 광 변환효율은 빛에너지를 이용할 수 있는 최대 양자 효율이 높을수록 많은 수소를 생산한다고 알려져 있으며, 이는 균주 내부의 광화학적 변수인 광반응센터의 수 및 안테나 크기 등에 비례하며 이에 관련한 연구가 유전공학적으로 수행되고 있다. 또한 수소 생산율을 높이기 위한 외부적인 조건으로 광원의 파장, 세기, 광합성 반응기의 형태 등에 의해 영향을 받고 있으며, 대규모 반응기의 실질적인 적용에 초점을 두고 효율적인 광 공급 및 분산을 목표로 연구되고 있다.

본 연구에서는 광합성 홍색비유황세균인 Rhodobacter sphaeroides KD131의 수소생산을 최적화하기 위하여 광합성 배양기의 형태 및 광원의 영향을 실험실 규모에서 검토하였다.

## 2. 실험 재료 및 방법

혐기성 광합성 세균인 purple non-sulfur bacteria, Rhodobacter sphaeroides (Rb. sphaeroides) KD131 wild type을 사용하였다. 이 균주는 서강대학교 생명과학과 이정국 교수연구팀이 광양만에서 분리·동정한 균주이다<sup>5)</sup>.

Rb. sphaeroides KD 131의 모든 배양은 초기 균체농도가 660nm서 흡광도 0.5가 되도록 접종하고, 배양기 내를 아르곤으로 치환하여 혐기조건을 만든 후 30°C 항온실에서 이루어졌다. 광원으로 할로겐등을 사용하였으며 한쪽에서만 8 klux을 조사하였다. 배지는 종 배양용으로 succinate를 탄소원으로 함유하는 modified Siström 균체 배양용 배지를 사용하고, 본 배양용으로는 malate를 탄소원으로 함유한 modified Siström 수소생산용 배지 또는 lactate를 함유한 GL배지를 사용하였으며, 2N KOH로 pH 6.8을 맞춘 후 멸균하여 사용하였다. Serum bottle 배양의 경우 하루에 5회 상하로 균체를 흔들고, 수직·평판형 배양기 및 컬럼형 배양기는 magnetic stirrer (100rpm)로 교

김미선 · 배진숙

Table 1 Effect of growth condition on pH and hydrogen production of *Rb. sphaeroides* KD131

배양시간	증배양조건	pH	총 가스량 (ml)	수소 (%)	수소생산량 (ml H <sub>2</sub> /ml-broth)
24	혐기/광	7.25	43	31.8	0.69
	호기/암	7.26	39	14.4	0.3
48	혐기/광	7.14	78	48.1	1.9
	호기/암	7.19	67	43.3	1.5
72	혐기/광	7.12	93	55.9	2.6
	호기/암	7.16	87	51.0	2.2

μl 채취하여 가스 크로마토그래피 (Shimadzu 14-B)로 분석하였다<sup>6)</sup>. 사용된 컬럼은 300 mm × 2 mm (길이×지름)로 molecular sieve 5A (Supelco Inc.)를 충전물질로 사용했으며, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 분석 조건은 column, injector, detector 온도가 각각 80 °C, 100 °C, 120 °C이었으며, carrier 가스는 아르곤으로 flow rate 35 ml/min로 유지하였다. 유기산 분석은 Aminex HPX-87H, 300×7.8 mm (길이×내경)를 장착한 HPLC (Shimadzu LC-10AT)를 사용하여 30 °C에서 분석하였으며, UV detector를 이용하여 파장 210 nm에서 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 mobile phase로 하여 flow rate 0.6 ml/min로 용출하면서 분석하였다. 배양액의 pH는 pH meter (TOA, model 30G)로 실온에서 측정하였고, 균체농도는 일정시간 간격으로 채취한 발효액을 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1601)로 파장 660 nm에서 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 *Rb. sphaeroides* KD131 wild type의 균체성장

*Rb. sphaeroides* KD131은 malate 30mM이 탄소원으로 첨가되고 L-glutamic acid 및 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 질소원으로 첨가된 Sistrom 합성배지에서 할로겐 등을 이용한 8 klux 광도의 광합성

조건에서 균체가 성장하고 수소를 생산하였다 (Fig. 1). *Rb. sphaeroides* KD131의 성장 대수기는 약 배양 40시간까지 지속되었으며, 수소 생산은 대수기의 중간인 약 24시간부터 시작되었고, 균체 성장이 정지된 후 까지도 계속 되었다. 배양 초기 pH는 7.0이었으며 균체가 성장하면서 증가하기 시작하여 약 20-24시간에는 8.6-8.8까지 증가하였고, 배양 20시간 이후부터 7.4-7.7로 감소하였다. 본 배양 조건에서 성장 대수기의 *Rb. sphaeroides* KD131 세대시간은 약 7.56 시간이었고, 배양초기의 pH 상승은 질소원으로 첨가된 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로부터 발생한 암모늄 이온에 의한 것으로 균체가 성장하면서 이 이온은 질소원으로 소비되어서, pH가 다시 낮아진 것으로 사료된다.

#### 3.2 *Rb. sphaeroides* KD131 wild type의 광/암 배양 조건과 수소생산

통성혐기성 균주인 *Rb. sphaeroides* KD131 wild type의 종균 배양조건이 균체 성장 및 수소생산성에 주는 영향을 조사하기 위하여 균체를 각각 혐기/광 조건과 호기/암 조건으로 나누어 배양하였다. 혐기/광조건 배양은 serum bottle에 균체농도가 10%가 되도록 균체를 접종하고 고무마개와 알루미늄 덮개로 덮은 후 아르곤으로 치환하여 혐기조건을 만들고 할로겐 등으로 약 8 klux를 조사하면서 30°C, 24시간동안 배양하였다. 호기/암조건 배양은 같은 방법으로 10% 균체를 접종

후 아르곤을 배양기 내 가스를 치환하지 않고, 숨마개를 하여 호기조건, 어둠에서 30 °C로 24시간 동안 배양하였다. 위의 두 가지 방법으로 배양된 종균은 각각 실험 재료 및 방법에서 기술한 데로 50 ml serum bottle을 이용하여 수소생산과 균체 증식을 관찰하였다. 초기 pH는 7.0으로 조절되었고 배양시간 경과에 따른 pH 변화 및 배양기 내의 총 가스량을 측정하고, 수소 함량을 분석하였다.

종배양 조건이 혐기/광합성 조건인 경우 균체는 자연광 및 할로젠 등에서는 고동색을 띄고, 형광등에서는 녹색을 나타냈으며, 배양 기간 동안 균체성장이 좋았다. 그러나 호기/암 조건에서 종배양한 균체는 붉은색을 띄고 같은 배양시간에 비교 하였을 때 성장이 늦었다. 혐기/광 및 호기/암 조건에서 종 배양한 균체를 사용하여 본 배양한 결과를 Table. 1에 나타내었다. 혐기/광조건 배양의 경우, 배양시간 동안 줄곧 수소생산이 우수하였고, 수소함량도 호기조건에서 배양한 균체보다 높았다. 그리고 72시간 배양 후 2.6 ml H<sub>2</sub>/ml-broth 수소가 생산된 반면, 호기/암 조건의

경우 초기 수소생산 속도도 느렸고 72시간 배양 후 2.2 ml H<sub>2</sub>/ml-broth로 혐기/광조건에서 생산된 것 보다 낮았다.

### 3.3 광세기 비교

Rb. sphaeroides KD131 wild type 균체를 660nm 파장에서 흡광도가 0.5가 되도록 균체를 첨가하여 30 °C에서 광세기의 영향을 검토하기 위하여 배양 하였다. 광원은 할로젠 등이며, 각각 3~3.5 klux, 7~8 klux, 15~16 klux, 30~32 klux, 50~52 klux, 100~110 klux의 조도로 구분하여 광합성 균주가 담긴 serum bottle의 한 면에 빛을 조사하였다. 빛 세기는 조도 측정계를 시료병 전면에 위치하여 측정된 결과로 배양기 내부는 균체 농도나 배양기의 재질 및 두께에 따라 빛을 받는 세기가 달라진다. Fig. 3은 위에서 기술한 실험 조건에서 Rb. sphaeroides KD131 wild type 균체가 성장하면서 균체농도가 흡광도 0-3.0 까지 증가할 때 할로젠 등의 빛 투과율을 배양기 전/후면에서 측정된 결과이다. 균체가 없는 경우는 배양기의 빛 투과율이 1보다 상승하여 배양기 유

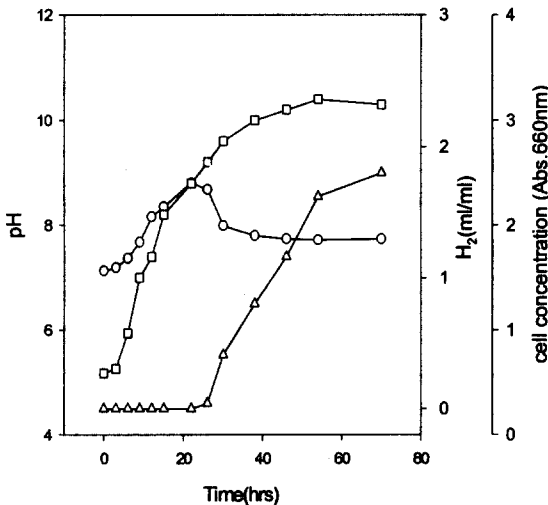


Fig. 2. RHydrogen production and cell growth of *Rb. sphaeroides* KD131 wild type  
 △, total hydrogen produced;  
 □, cell concentration; ○, pH of broth

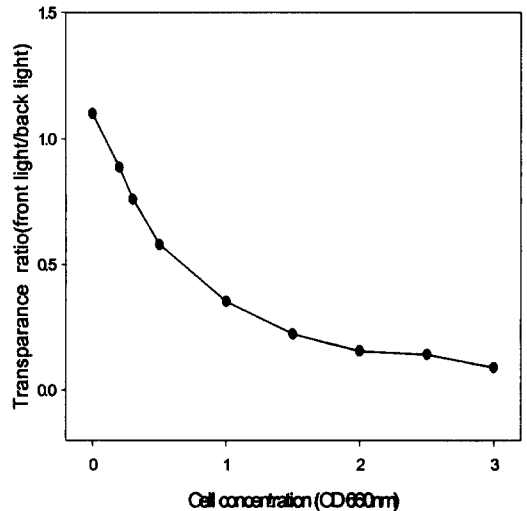


Fig. 3. Effect of cell concentration of *Rb. sphaeroides* KD131 wild type on light transparency

Table 2 Effect of light intensity on hydrogen production and cell growth of *Rb. sphaeroides* KD131

light intensity (klux)	pH	균체농도 (abs.660nm)	H <sub>2</sub> produced (ml H <sub>2</sub> /ml-broth)
0	6.84~6.88	0.32~0.35	0
3~3.5	7.43~7.53	3.02~3.39	0.65~0.76
7~8	7.51~7.75	2.90~3.39	0.94~1.00
15~16	7.70~7.79	2.62~3.12	0.59~0.90
30~32	7.80~7.85	2.66~3.02	0.61~0.78
50~52	7.84~7.96	2.82~2.83	0.64~0.68
100~110	7.70~7.72	1.64~1.74	0.11~0.28

리에 의한 반사효과를 관찰하였다. 균체농도가 흡광도 0.5 이상일 경우 조사한 빛의 60% 정도가 배양기를 투과한 반면, 균체 농도가 흡광도 1.0 이상일 경우는 조사한 빛의 투과율은 현저히 감소하여 1.5~3.0에는 빛의 20% 만이 투과하였다. 이러한 균체농도의 증가에 따른 급격한 빛 투과율의 저하는 광합성 세균의 광이용 효율에 직접적인 영향을 주고 있으며 배양 중 교반이나 빛의 반사효과를 높이기 위한 거울등의 반사체 설치로 빛 이용 효율을 최대화 할수 있다. 동일한 실험 조건에서 예비 실험 결과 연속적으로 교반할 경우와 하루에 4번 균체가 담긴 배양기를 상하로 약 10초 동안 교반 후 배양할 경우 균체 성장이나 수소 발생이 동일하였기 때문에 본 실험에서는 serum bottle를 이용한 수소생산 실험에서는 균체를 하루에 5회 교반하였다.

각 조도에 대한 배양 중 하루에 5회 균체를 섞어주며 48시간 배양하였고 균체 성장 및 수소생산량을 Table 2에 나타내었다. 균체농도는 광 세기가 3~3.5 klux와 7~8 klux 일 때 가장 높았으며, 100~110 klux 이상으로 조사한 경우 균체 성장에 저해를 받아서 최적 빛 세기 조건과 비교하여 약 50%의 균체 성장률을 나타내었다. 조사

량 100~110 klux 이상일 때는 48시간 동안 균체 흡광도가 660nm에서 약 1.6~1.7로 성장했으나 이후 균체가 가지는 bacteriochlorophyll 이 800nm 이상의 파장 빛을 받아 나타나는 붉은 색소를 잃고, 하얗게 표백화되었다. 이러한 현상은 빛의 광도가 30~32 klux 이상을 조사한 모든 균체에서 발생하였으나 그정도는 빛의 세기가 높을수록 빠르게 진행되었다. 균체 표백화에 대한 정확한 요인은 아직 밝혀지지 않았고, 태양광과 같은 강한 빛 세기에서 발생하거나, 배양기 중에 발생한 수소가스가 제거되지 않고 배양액 중에 축적될 때 생기는 pH의 저하에 의한 경우가 보고되고 있다<sup>7)</sup>. 이와 같은 현상은 수소생산량에 영향을 주어서 50~52 klux의 경우 7~8 klux의 경우보다 수소생산량이 약 30% 감소하였다. 또한 100~110 klux의 경우에는 균체성장도 낮았으며 동시에 수소생산량도 7~8 klux의 경우보다 70~90% 가량 감소하였다.

### 3.4 광합성 배양기 영향

50 ml 용량 유리 serum bottle (Fig. 1-A), 3.6 L 용량 스테인레스 측면/유리 양면으로 제작된 수직평판형(flat vertical) 유리 배양기 (Fig. 1-B), 3.6 L 용량 아크릴로 제작된 수직평판형 배양기

Table 3 Effect of reactor type on hydrogen production of *Rb. sphaeroides* KD131 wild type

배양기 모양		serum btl.	flat 양면유리	flat 사면아크릴	컬럼형	코일형
배양기 dimension	직경x높이(cm)	3.5 x 5.5	-		3.5 x 26	관 직경, 1.74
	폭x 높이x 두께 (cm)	-	20 x 30 x 6	20 x 30 x 6	-	코일직경, 20 높이, 55
	total volume (ml)	50	3,600	3,600	1,000	3,000
	working volume (ml)	20	3,000	3,000	900	3,000
수소발생율 (ml H <sub>2</sub> /ml-broth)		1.0-1.6	0.37-0.41	0.8-1.0	0.51-0.62	0.1-0.15

(Fig. 1-C), 1 L 용량 유리 컬럼배양기 (Fig. 1-D) 및 유리로 제작된 코일형배양기 (Fig. 1-E) 를 이용하여 각각의 수소생산성을 비교하였다. 광합성 세균에 의한 수소 생산을 최대화하기 위해서는 미생물의 낮은 빛 전환효율 개선, 높은 광 세기에서의 광 저해 현상, 암 조건에서의 수소소 비현상 등 미생물 자체가 가지는 유전적인 인자를 개선해야 하지만 동시에 효율적인 광합성 생물 반응기, 즉 최적 균체 성장 및 수소생산을 유도할 수 있는 빛이 배양기의 모든 부분에서 골고루 분산되는 배양기를 경제성 있는 재질과 형태로 제작·고안하여 연속적으로 수소를 생산할 수 있는 연구가 필요하다. 이러한 연구는 아직 전 세계적으로 초기 상태에 있으나, 일부 베타 카로틴과 같은 고부가가치 물질을 추출을 위한 원료 바이오매스 생산용 녹조류 배양 개방 연못형 배양기가 상용화되었고, 그 외에는 코일형 배양시설, 태양광을 내부로 받아들인 내부 조명형, 생물배양 시설, 수직 모듈과 형태, 호수 위에 띄운 floating 형태 등이 각국에서 실험실 규모로 검토되고 있다<sup>8,9)</sup>. 본 연구에서는 Fig. 1에서와 같이 column

형태, vertical rectangular 형태, coil 형태의 광합성 배양기를 유사한 배양 조건에서 수소생산성과 균체 성장을 검토하였다. column 형태 반응기는 Fig. 1-A와 D의 형태이고, 크기 및 부피는 Table 3의 A, D에 표시하였다. 수소 발생률은 동일한 직경의 column 형이지만 A배양기가 약 2배가량 높은 수소 생산율을 나타내었다. 이와 같은 형태이지만 크기가 대형화될 때 빛이 골고루 분산되는 것이 어렵고 일부 어두운 곳이 발생해서 수소 생산이 저하되는 것으로 사료된다. 태양광이 균체가 존재하는 배양기 내를 통과할 수 있는 깊이는 약 3 cm로 보고되어 있으며, 예비 실험 결과 광합성 배양기가 평평한 형태는(배양기 B, C) column(배양기 A, D)형과 비교하여 빛의 분산이 일정하여 배양기 내부의 빛을 받는 세기가 비교적 일정하였다. 배양기 B와 C는 빛을 받는 부분이 평평한 flat vertical 형태의 광합성 배양기로 두께가 8 mm인 유리와 투명아크릴을 재질로 사용하여 각각 제작하였다.

*Rb. sphaeroides* KD 131 wild type은 전면이 투명 아크릴로 제작된 평판형 수직 배양기 (총부

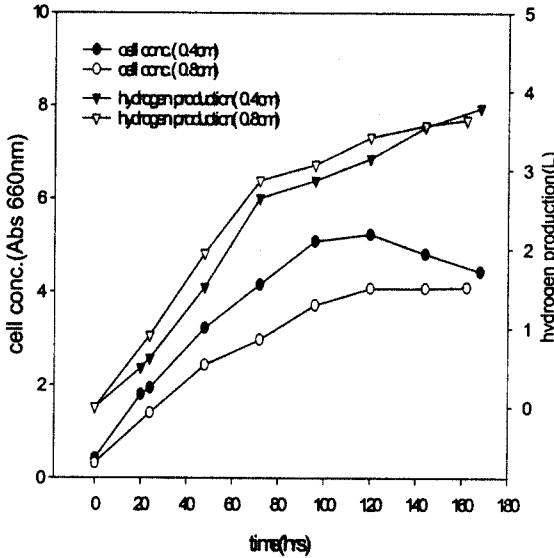


Fig. 4. Effect of acrylic width of flat vertical reactor on hydrogen production (Cells were cultured using 30mM lactate and D-L-glutamate as carbon source and nitrogen source, respectively.)

피 3.6 L, 배양액 부피 3 L)는 8-9 klux 조도로 pH를 조절하지 않고 30°C에서 30 mM malate를 첨가한 sistroom 배지로 배양하였을 때 양면만 유리로 제작된 동일한 크기의 배양기에서보다 2배 이상의 수소를 생산하였다. 유리와 아크릴은 모두 투명재질이었으며 빛 투과도에 대한 비교는 같으나, 유리 반응기는 그 가공 특성상 전면을 유리로 하지 못하고 옆면은 스테인레스스틸로 지지하였기 때문에 빛을 받는 면적이 감소하였다.

Pyrex 유리로 제작된 coil형 광합성 생물배양기는 유리관 (외경 1.94cm, 내경 1.74cm)을 약 20cm 직경의 실린더 형태로 감아서 높이 55~57cm이며, 부피는 약 3.0ℓ이었다. 아크릴로 제작된 배양기의 재질 두께를 각각 0.4 및 0.8cm로 사용할 때 균체 생성에 영향을 주었다. 즉 0.4cm 두께로 제작했을 때 광합성에 의한 균체생성이 48시간 배양동안 약 1.4배 증가하였다. 그러나 수소생산은 오차범위 내에서 변화를 나타내지 않았다. 균체의 증가는 수소생산에 비례적인 증가

를 유도할 수 있으나 부 실험에서는 이미 충분한 농도의 균체가 확보되어 오히려 높은 균체 농도는 빛 투과율을 저하시켜 수소생산에 증가적인 효과를 나타낼 수도 있다. 배양 중의 시간이 경과함에 따라 배양액을 교반할 때에도 균체가 멎치거나 배양기 벽에 붙는 경우가 종종 발생하였으며 이러한 현상은 최종적으로 균체농도가 저하되는 것과 같은 현상을 나타내었다(Fig. 4). 코일형 생물배양기는 다른 생물 반응기와 비교하여 동일한 배양조건에서 균체를 순환하면서 교반하였을 때, Rb. sphaeroides KD131 wild type은 약 24시간 후 균체 증식이 2배 이상 도달하였다. 그러나 수소발생량은 다른 형태의 배양기보다 낮았다. 이와 같은 이유는 배양액을 순환하기 때문에 발생한 수소가 외부로 모두 방출되지 않고 일부는 코일배양기 중에 trap되거나 배양액과 같이 순환하였다. 이와 같은 현상은 배양액 중의 pH를 낮춰서 formic acid가 대량 축적되었으며, 균체는 약 96시간 이후부터 pH저하에 의한 표백화 현상을 보였다. 본 실험에서 검토된 킴형, 수직평판형 및 코일형 생물 배양기 중에서 수직평판형(flat vertical type) 배양기가 Rb. sphaeroides 균체배양 및 수소생산에 가장 적합하였으며, 투명아크릴 재질이 비교적 가공이 간편하고 가격이 저렴하여 광합성 생물 배양기의 대형화에 적합하였다.

## 후 기

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

## 참 고 문 헌

- 1) C.B. Van Niel: Bacteriol. rev., vol. 8, 1944, p.1.
- 2) E. D'Addario, E. Fascetti, and M. Valdiserri. Hydrogen energy progress at proceeding of the 11th, 1996, p.2577.
- 3) H. Gaffron, and J. Rubin: J. Gen. Physiol.,



- vol. 26, 1942, p.219.
- 4) P. Hillmer, and H. Gest: J. Bacteriol., vol. 129, 1977, p.724.
  - 5) I.H. Lee, J.Y. Park, D.H. Kho, M.S. Kim, and J.K. Lee: Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 60, 2002, p.147
  - 6) 김미선, 문광웅, 이상근: Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol.26, 1998, p.89.
  - 7) M. Miyake, M. Sekine, L.G. Vasilieva, E. Nakada, T. Wakayama, Y. Asada, and J. Miyake: Biohydrogen, 1998, p.81.
  - 8) Development of environmentally friendly technology for the production of hydrogen, New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), Global Environment Technology Department Brochure.
  - 9) J.P. Szyper, B.A. Toza, J.R. Benemann, M.R. Tredici, and O.R. Zaborsky: Biohydrogen, 1998, p.441.