

## *Enterobacter cloacae* YJ-1의 고정화세포에 의한 과일 폐기물로부터 수소생산

이 기 석 · 허 양 일 · 정 선 용 · † 강 창 민  
전남대학교 공과대학 환경공학과, <sup>1</sup>초당대학교 공과대학 환경공학과  
(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

### Hydrogen Production from Fruit Wastes by Immobilized Cells of *Enterobacter cloacae* YJ-1

Ki-Seok Lee, Yang-il Huh, Seon-Yong Chung, and Chang-Min Kang<sup>1†</sup>

Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Chodang University, Muan, Chonnam 534-701, Korea

(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

The hydrogen production using immobilized cells was conducted using fruit wastewaters at various culture conditions. Three kinds of fruit wastewaters, melon, watermelon and pear were used. Sodium alginate was used as immobilization material. Among them, concentration of reducing sugar which was one of the main components in fruit was the highest at watermelon wastewater, and also hydrogen production was the highest as 2319.2 mL/L in it. Although hydrogen production was not much changed according to sodium alginate concentration, its production was the most at 3% (w/v). As bead size as small, hydrogen production was higher. With inspection of interior, it confirmed that the cell grew well in bead. But the addition of amino acids using as agent for metabolite production had almost no affected on hydrogen productivity. The effective range of FeSO<sub>4</sub> addition on hydrogen production were up to 1.2 g/L, and above the concentration, it inhibited the productivity. Organic acids produced during watermelon fermentation were mainly lactic acid, butyric acid, and acetic acid; and a little of propionic acid.

**Key Words** : Hydrogen production, immobilization, organic wastewater, FeSO<sub>4</sub> concentration

#### 서 론

화석연료의 과다사용에 의한 자원고갈과 그에 따른 심각한 대기오염이 전 지구적 차원의 문제점이 되고 있어 깨끗하고 지속적인 대체에너지 시스템개발에 많은 관심이 모아지고 있다. 환경친화적 연료의 하나인 수소는 대량연소 후에도 2차 공해를 유발하지 않는 청정연료로서 주목받고 있다(1-3). 따라서 수소는 대체에너지 시스템을 실현할 수 있는 높은 가능성을 갖고 있다. 한편 기존의 수소제조기술은 주로 석유나 천연가스 열분해에 의하여 제조되거나 다른 화학공정의 부산물로부터 얻어지고 있으나 최

근에는 생물학적 방법에 의한 수소생산 연구가 주목되고 있다. 생물학적 수소생산 방법에 있어 대부분 인공기질이 이용되어 왔으나, 환경 친화적이며 화석연료를 대체할 수 있는 연료로서 각광받고 있는 것이 바이오매스 자원이다(5). 이는 생태학적 관점에서 볼 때 재생성이 있는 생물자원으로 평가되며, 물질자원으로도 활용될 수 있는 장점을 지니고 있다(4). 특히 생물분해가 잘 이루어지며, 당농도가 높은 농산폐기물의 기질 이용 연구가 시도되고 있다.

한편 수소생산 효율을 향상시키기 위한 방법의 하나로 고정화 세포의 이용이 연구의 대상이 되고 있다(6). 이 세포의 고정화는 담체 내에 세포의 이동을 제한한 것으로서 세포의 손상이나 유실 등을 방지하여 장시간 세포의 안정성을 유지시켜 주는 장점을 지니고 있다(7). 그 외에도 고정화 세포를 이용하여 cellulose, methane, ethanol, L-malic acid 생산 등 의약, 화학품 제조분야에서 생산성의 개선 문제로 많은 연구가 진행 중이다. 일반적으로 생세포계는 배양시 배양기 내의 발효산물의 자체에 영향을 받기 쉽다.

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Chodang University, Muan, Chonnam 534-701, Korea

Tel : +82-61-450-1266, Fax : +82-61-450-1266

E-mail : cmkang@chodang.ac.kr

혐기성 세균의 경우 수소생산 관련효소인 nitrogenase는  $O_2$ 에 대해 매우 불안정하여 생산수율이 상당히 낮아지는 결과를 가져오게 된다. 하지만 고정화 세포는 반응기 내에서 세포가 고농도로 유지하게 되며, 온도, pH와 같은 환경조건이 변화하거나 저해물질 등이 유입되어도 직접 고정화된 완충작용에 의해 활성이 변화하지 않아 생산시스템에 유용하게 이용될 수 있다(8). 고정화 담체로서는 sodium alginate, k-carrageenan, polyacryl amide, glass bead, collagen, agar 같은 polymer가 사용되고 있으며, 이 중 alginate가 미생물의 대사를 장기간 유지시켜주어 고정화 물질로 널리 사용되고 있다. 또한 고정화 과정이 비교적 간단하고 세포가 고정화 담체 내에서도 생존하며, pH 5~10에서도 화학적으로 안정하고 고온에서도 열적 안정성을 유지할 뿐만 아니라 가격이 비교적 저렴하다는 장점도 있다(9, 10).

본 연구에서는 혐기성 세균인 *Enterobacter cloacae* YJ-1의 고정화 세포를 이용하여 농산폐기물로부터 수소를 생산하고자 할 때, 발효과정에 미치는 주요조건을 검토하여 배양의 최적화를 기하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 *Enterobacter cloacae* YJ-1로 자연계로부터 수소생산을 위해 본 연구실에서 직접 분리한 균주이며(11), 이 균주를 고정화하여 실험하였다.

### 배지 및 배양조건

본 실험에서 사용된 배지의 조성은 1 L의 증류수에 yeast extract 1.0 g, ethanol 0.5 mL, disodium succinate 1.0 g, ferric citrate solution (0.1%) 5 mL,  $KH_2PO_4$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4 g, NaCl 0.4 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.05 g,  $NH_4Cl$  0.4 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.05 g, Trace element solution 0.1 mL로 이루어졌다. Trace element solution은 1 L에  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.03 g,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  0.02 g,  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  0.02 g,  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  0.03 g이다. 전 배양은 100 mL 용량 vial에 40 mL의 배지를 넣고 균주를 접종하여 고무마개와 알루미늄 덮개로 밀폐한 후, 아르곤 가스를 흘려서 혐기조건을 만들었다. 배양은 35°C, pH 7.5, 120 rpm에서 2일 동안 성장시켰다. 본 배양은 100 mL 용량 vial에 60 mL의 배지를 넣고 전 배양에서 성장시켜 고정화된 세포를 10% 접종하여 전 배양과 같은 조건으로 회분식 배양하였다.

### 유기성 폐기물

실험에 사용된 유기성 폐기물은 광주광역시 농산물 시장에서 발생하는 폐기물로 참외, 수박, 배를 다량 수거하였다. 회수된 과일폐기물은 믹서기 (SFM-1000DLI)로 분쇄시킨 후, 발생하는 분리액을 -20°C에서 보관 후 사용하였다.

### 세포의 고정화

*Enterobacter cloacae* YJ-1의 고정화 방법은 액체배지로 전 배양시킨 배양액과 sodium alginate 용액을 혼합하여 1~4%

(v/v)의 농도로 제조한 비드를 0.1 M  $CaCl_2$  용액 30 mL 중에 drop으로 떨어뜨려 완전구형의 비드를 제조한 것을 37°C, 2시간 동안 온화하게 교반하면서 gel화를 시켰다. 그 다음 비드를 증류수로 세척하고 본 배양액에 옮겨 배양실험을 행하였다. 비드의 크기는 4가지 다른 크기의 needle을 이용하여 각기 다른 크기의 비드를 제조하였다.

### Gel bead의 내부관찰

주사전자현미경 (JEOL JSM-5410LV, Japan)을 이용하였으며 비드 중심부의 균주관찰을 위해서는 배양이 끝난 비드를 증류수로 3회 세척하고, 2.5% glutaraldehyde 용액에 하룻밤, 1%  $OsO_4$  용액에 2시간 방치하였다. 이를 다시 증류수로 세척한 후 30~100% 에탄올 용액에 담구어 탈수시킨 후 아세톤에 담구어 건조시켜 현미경 촬영시료로 사용하였다.

### 분석방법

수소함량은 반응기내 head space 가스를 gas tight syringe로 0.2 mL 취하여 gas chromatography (Shimadzu, GC-14B)로 분석하였다. 사용된 column은 3 m × 2 mm (길이×지름) glass로 molecular sieve 5A (supel. Inc)를 충전물질로 사용하였으며, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 수소분석의 조건은 column 온도 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C이었으며, carrier gas는 argon이며, flow rate는 35 mL/min으로 유지하였다.

유기산 분석은 발효액을 채취하여 균체와 상등액을 분리한 후 상등액 400  $\mu$ L을 5 N HCl 50  $\mu$ L로 산성화한 후, internal standard 물질로 1% 1-propanol 40  $\mu$ L를 첨가하였다. Porapak QS를 충전물질로 하는 3 m × 2 mm ID column을 이용해서 gas chromatography (Shimadzu 14-B)를 flame ionization detector (FID)와 연결하여 분석하였다. 분석조건은 column 온도 230°C, injector 온도 220°C, detector 온도 220°C이며, carrier 가스는 질소를 flow rate 50 mL/min로 사용하였다.

배양액 중의 환원당 농도는 DNS (Dinitrosalicylic acid) 발색법을 사용하였다. 배양액을 25,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액 3 mL와 DNS 시약 3 mL를 혼합한 후 5분간 끓이고 즉시 40% Rochelle salt solution 1 mL를 첨가한다. 이 혼합물을 냉각수로 냉각시킨 후 575 nm에서 흡광도를 측정하고 당 농도와 흡광도 간의 표준곡선에 준하여 정량하였다. Starch의 농도는 5.5 N HCl 0.2 mL과 2.2 mL  $Na_2CO_3$ 를 첨가하여 중화시키고 DNS 방법으로 정량하였다. BOD, COD, total solids, suspended solids, volatile solid는 standard method(12)로 측정하였다. 배양액의 pH는 pH meter (Orion, model 420A)로 실온에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 각종 유기성 폐기물로부터 수소생산

본 실험에서 사용된 농산 폐기물은 참외, 수박, 배로 농산물 시장에서 다량 수거하여 물리적 전처리 후 폐액을 분석하였고, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 참외, 수박, 배에서 환원당이 각각 41,981 mg/L, 43,512 mg/L, 39,213

mg/L이었으며 starch는 검출되지 않았다. 이 과일 폐액은 높은 환원당을 가지고 있어 수소생산에 높은 이용가치를 갖는다. 세 종류의 과일폐기물 모두 BOD가 40,000 mg/L 이상으로 고농도 유기성 폐수이었다. Fig. 1은 고정화 세포에 의한 각종 과일 폐액으로부터 생산된 수소를 나타내었다. 참외 폐기물을 이용하였을 때 수소생산은 112시간 동안 총 2062.2 mL/L이었다. 환원당은 거의 대부분 소모되었다. 수박 폐기물에서는 다른 폐기물보다 더 많은 양의 수소가 생산되어 2319.2 mL/L이었다. 배 폐액에서는 수소가 1894.7 mL/L이었으며 환원당은 80시간에 전량 소모되었다. 과일 폐액의 pH는 발효가 진행되는 동안 점차 낮아져 수소생산이 정지되었을 때 pH 5.3이었다. 다음 실험에서는 수소생산량이 높은 수박 폐액을 이용하였다.

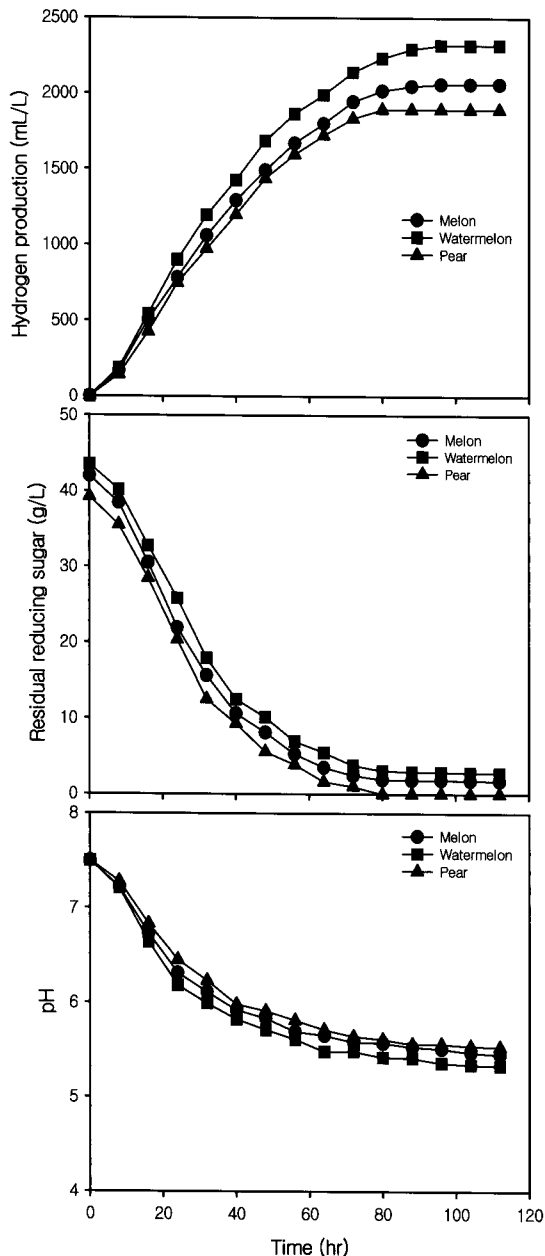


Figure 1. Hydrogen production from melon, watermelon and pear wastewater by immobilized cell with 2% (w/v) sodium alginate and 3 mm bead.

Table 1. Composition of various organic wastewater

Item	Melon wastewater	Watermelon wastewater	Pear wastewater
Reducing sugar(mg/L)	41,981	43,512	39,213
Starch(mg/L)	0	0	0
BOD(mg/L)	42,391	46,074	40,522
COD(mg/L)	54,902	57,472	52,273
TS(mg/L)	69,457	63,373	66,675
SS(mg/L)	6,982	7,936	7,843
VS(mg/L)	50,413	52,264	47,858

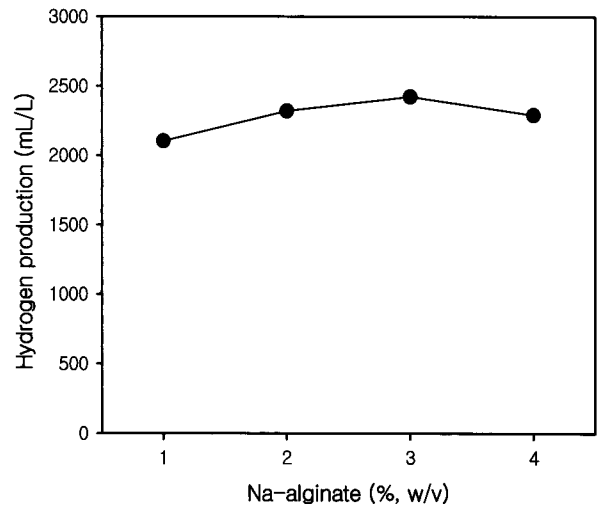


Figure 2. Effect of sodium alginate concentration on hydrogen production from watermelon wastewater by immobilized cell with 3 mm bead.

비드농도 및 크기의 영향

수소생산을 위한 담체로서 일반적으로 널리 이용되고 있는 sodium alginate를 사용하였다. 비드의 안정성은 사용된 alginate의 농도에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다(13, 14). Sodium alginate를 1~4% (w/v)의 농도범위로 변화시키면서 각각의 수소생산을 조사하였다. 그 결과, Fig. 2에서와 같이 3% (w/v)에서 약간 높은 생산량을 보였으나 전체적으로는 수소생산량에 거의 차이는 없었다. 이는 실험에 사용한 농도가 임의의 환경에서 담체 내 고정화 세포가 외부환경의 영향을 적게 받으면서 영양분을 이용하는 적정 농도범위 내에 모두 존재했기 때문으로 생각된다. 일반적으로 담체의 농도가 지나치게 높을 경우 기질 및 영양분의 비드내부로의 유입이 제한을 받게 된다(15, 16). 본 실험에서도 5% (w/v) 이상의 농도에서는 담체의 점성으로 인하여 고정화 작업 자체가 어려웠다.

본 연구에서 사용되는 3% (w/v) sodium alginate는 이미 보고된 *Aspergillus niger*(17)의 적정 담체농도와 유사하였다. 다음 실험은 3% (w/v)의 sodium alginate로 세포를 고정화하여 사용하였다.

고정화 비드의 크기에 따른 수소생산을 조사하기 위해 주사기 needle의 직경을 달리하여 2~5 mm 크기의 비드를 제조하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 수소생산량은 비드의 크기가 작을수록 유리한 것으로 나타났으나 전체적으로는 큰 효과가 없었다. 고정화 배양에서 비드의 크기, 농

도, 표면적 등이 생산수율에 영향을 줄 수 있기 때문에 고정화 조건이 중요한 배양인자로 될 수 있다. 비드제조시 3% (w/v) sodium alginate의 농도에서는 2 mm 이하의 비드가 쉽게 형성되지 않은 어려움이 있었다. 다음 실험에 2 mm의 비드가 사용되었다.

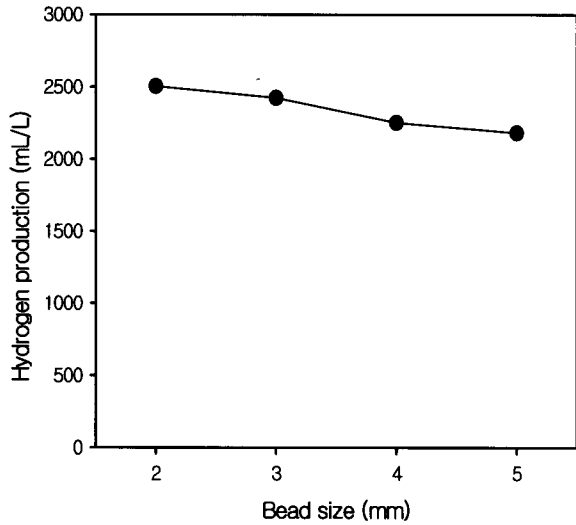


Figure 3. Effect of bead size on hydrogen production from watermelon wastewater by immobilized cell with 3% (w/v) sodium alginate.



Figure 4. Scanning electron microscopy of immobilized *Enterobacter cloacae* YJ-1 ((a) Internal surface before fermentation. (b) Internal surface after fermentation).

**비드 내의 세포관찰**

Fig. 4(a)는 발효 전 sodium alginate의 비드 내부를 관찰하였는데 세포가 하나씩 떨어져서 고르게 분포되어있는 것을 볼 수 있었다. Fig. 4(b)는 발효 후의 비드를 채취하여 비드 내부를 관찰한 결과 세포가 상당히 증식되어 잘 생존하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

**최적 고정화 조건에서 수소생산**

수박 폐액으로부터 위에서 얻어진 고정화 조건의 3% (w/v) sodium alginate와 2 mm의 비드를 이용해 고정화 세포와 유리세포의 배양시간에 따른 수소생산을 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 고정화 세포에서 수소는 104시간까지 꾸준히 생산하여 총 2505.4 mL/L이었다. 이는 고정화 세포가 유리세포보다 수소가 1.1배 증가한 양으로 표준편차를 고려하면 거의 수소생산성에 영향을 미치지 않았다. 그러나 기질의 종류가 달라지거나 혹은 농도가 증가하여 생성되는 대사산물에 의해 반응조 내부환경이 악화될 때 고정화의 효과는 상대적으로 커질 것으로 예상된다. 즉

고정화 세포는 외부 환경에 대한 안정성으로 인하여 미생물의 활성이 지속적으로 유지되므로 생산수율의 증진을 기대할 수 있다.

또한 고정화 시스템은 미생물의 농도가 최대가 될 수 있다는 장점도 있으며 scale-up시 목적산물의 향상을 위해서 고정화 조건에 관한 많은 연구가 진행되어야한다.

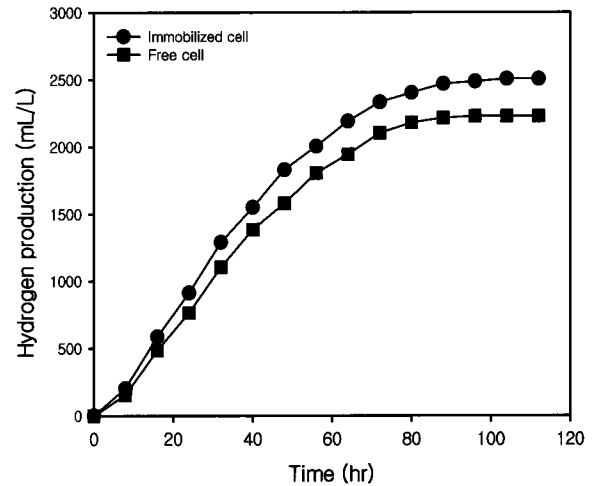


Figure 5. Comparisons of hydrogen production from watermelon wastewater by immobilized cell and free cell.

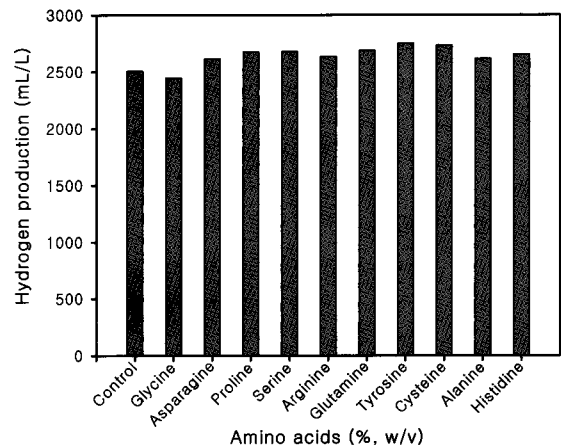


Figure 6. Effect of various amino acids on hydrogen production from watermelon wastewater by immobilized cell.

**아미노산 및 금속이온의 영향**

아미노산의 역할은 이차대사관여 효소물질 및 developmental regulator로서 대사산물의 생산을 위해 중요한 인자로 알려져 있다(18). Fig. 6은 각종 아미노산을 배지에 0.01% (w/v) 첨가하였을 때 수소생산의 변화를 조사하였다. 아미노산의 첨가여부, 종류가 생산성에 미치는 영향은 거의 없었다. 가장 효과적이라 할 수 있는 tyrosine의 경우도 대조구보다 1.1배 증가해 표준편차이내의 결과를 나타내었다.

금속이온은 균체생육의 필수적인 cofactor로서 균의 성장을 가속화시키고 대사산물을 향상시키지만 부적절한 금속이온의 농도에서는 균의 성장을 변화시켜 대사산물의 저하를 야기시킨다(19). Fig. 7은 금속이온을 첨가하여 수소생산이 정지될 때까지 관찰하였는데 FeSO<sub>4</sub> 농도를 0~5.0

g/L의 농도범위로 변화시켜 수소생산에 미치는 영향을 조사하였다. 무첨가 조건에서 수소생산량은 108시간에서 총 2750.3 mL/L였다. FeSO<sub>4</sub>의 농도증가에 따라 수소생산량은 서서히 증가하여 1.2 g/L, 98시간에 3417.9 mL/L로 최고치를 나타내었고, 이는 무첨가 대비 1.3배 증가한 것이다. 그러나 3.0 g/L 이상에서는 수소생산이 저하되었고, 12시간까지 수소가 생산되지 않는 긴 유도기가 관찰되었다. Fe 첨가는 세균의 균체 성장 등의 pleiotrophic 효과를 촉진시키는 것으로 추측된다.

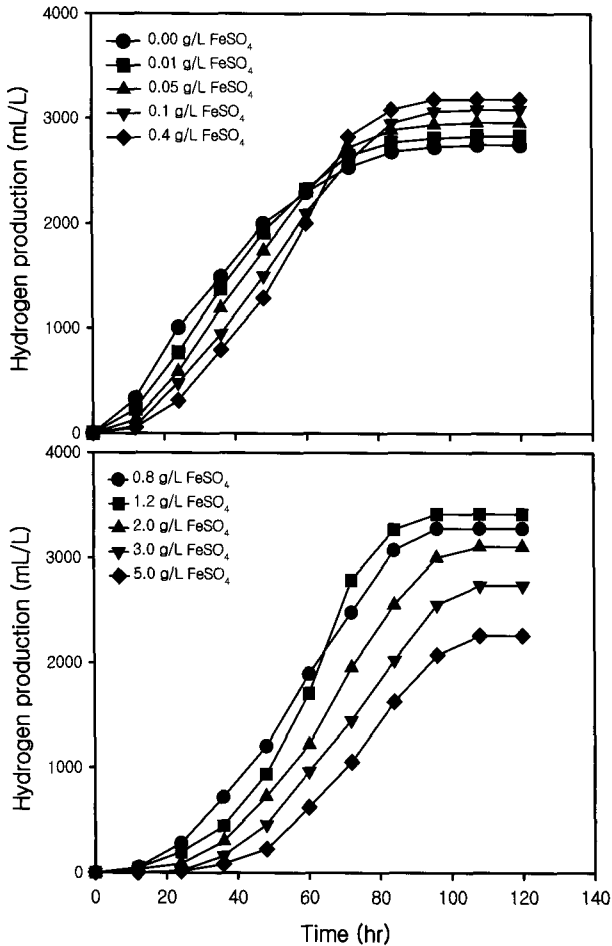


Figure 7. Effect of various FeSO<sub>4</sub> concentration on hydrogen production from watermelon wastewater by immobilized cell.

**유기산 생성**

수소생산이 정지된 후 배양액의 유기산을 분석하여 그 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 축적된 유기산은 lactic acid가 가장 많았으며 다음은 butyric acid 그리고 propionic acid가 소량 검출되었다. 2% (w/v) glucose를 기질로 사용한 이전의 연구(11)에서는 formic acid와 acetic acid가 많이 생성되어 기질종류에 따라 생성물에 차이를 나타내었다. 이는 발효산물의 종류 및 생성비율이 기질의 종류 및 배지의 농도에 따라 달라진다는 보고와도 일치한다(21, 22). 한편 초기 배양액의 pH가 7.5에서 발효 후 5.3 이상으로 저하되었다. 수소발효 중 생성된 유기산은 배양액의 pH 강하에 영향을 주어 세포 성장에 저해를 가져온다. 그러나 고정화로

세포활성의 저해를 완화시키고 유기산 생산 효소계를 안정화하여 효율적인 기질분해와 아울러 수소생산을 유도하였다고 여겨진다.

고정화 세포는 유리세포에 비해 우수한 생산 특성이 있음을 알 수 있었고 이를 보다 발전시키기 위해선 고정화 조건에 관한 많은 연구가 필요하다. 향후 보다 극심한 배양조건에서 고정화효과 검토와 수소생산수율을 최대화할 수 있는 발효조건 최적화 연구가 요구된다.

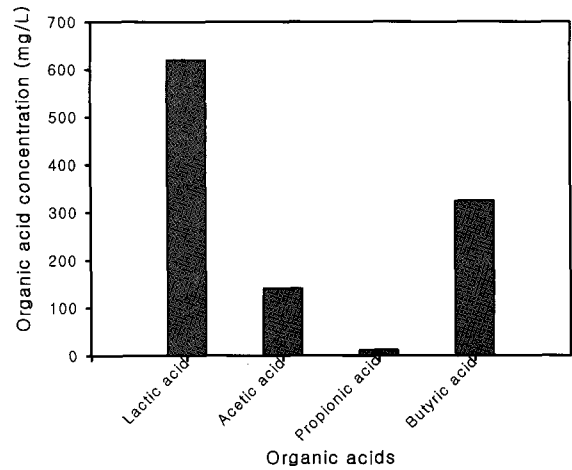


Figure 8. Organic acid concentration after fermentation of watermelon wastewater by immobilized cell.

**요 약**

본 연구에서는 과일 폐액으로부터 고정화 세포를 이용하여 수소생산을 위한 배양조건을 조사하였다. 각종 과일 폐액 중에 수박 폐액에서 환원당의 함량이 가장 높았으며, 수소생산량은 2319.2 mL/L이었다. 고정화 물질 sodium alginate의 농도와 크기에 따른 수소생산성 효과는 검토범위 내에서는 적었다. 고정화된 비드의 내부 관찰에서 세포가 왕성하게 생육하고 있음을 확인했다. 대사의 효소물질로 이용될 수 있는 각종 아미노산의 첨가는 종류에 관계없이 수소생산성에 영향을 거의 미치지 않았다. 금속이온 FeSO<sub>4</sub>를 첨가한 결과 최적 농도는 1.2 g/L이고, 1.3배의 수소생산 증가를 나타냈다. 수소생산정지 후 배양액의 유기산은 lactic acid와 butyric acid가 가장 많았다.

**REFERENCES**

1. Sawada, H. and P. L. Rogers (1977), Photosynthetic bacteria in waste treatment: pure culture studies, *J. Ferment. Technol.* **55**, 297-310.
2. Vignais, P. M., A. Colbeau, J. C. Wilson, and Y. Jouanneau (1985), Hydrogenase, nitrogenase and hydrogen metabolism in the photosynthetic bacteria, *Advances in Microbial Physiology* **26**, 155-234.
3. Bollinger, R., H. Zurrer, and R. Bachofen (1985), Photoproduction of molecular hydrogen from wastewater of a sugar refinery by photosynthetic bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 147-151.

4. Kondratieva, E. N. and I. N. Gogotov (1983), Production of molecular hydrogen in microorganisms, *Adv. Biochem. Eng.* **28**, 139-191.
5. Nagai, S., T. Kodama, K. Ohmiya, K. Miyamoto, S. Yokoyama, and H. Saiki (1996), Interim evaluation report of development of environmentally friendly technology for the production of hydrogen, NEDO, Tokyo, Japan.
6. Pimental D., I. L. Bennett, and C. Cooney (1983), *Solar Energy*, **30**, 1.
7. Leenen, J. E., A. P. Vitor, C. F. G. Katja, and T. Johannes (1996), Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Wat. Res.* **30**, 2985-2996.
8. George, R. S. and R. C. Clark (1983), Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing, and texturing agent, *Food Tech.* **4**, 63-70.
9. Britz, M. L., N. Simonov, and U. H. Chun (1997), Immobilized luminescent cell-based flow through monitoring of environmental pollutants, *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 250-257.
10. Leenan, E. J. T. M., V. A. P. Dos Santos, K. C. F. Grolle, J. Tramper, and R. H. Wijffels (1996), Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment, *Wat. Res.* **30**, 2985-2996.
11. Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung (2003). Isolation and characterization of hydrogen production bacterium, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 149-154.
12. ADHA, AWWA and WPCF (1995), Standard method for the examination of water and wastewater, 16th ed.
13. Cheetham, P. S. J., K. W. Blunt, and C. Bucke (1979), Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels, *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 2155-2168.
14. Tanaka, H., M. Matsumura, and I. A. Veliky (1984), Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 53-58.
15. Lim, D. J., B. J. Kim, S. K. Bae, J. D. Kim, and J. Y. Kong (1999), Immobilization of agarase for the agarooligosaccharide production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 208-214.
16. Hannoun, B. J. M and G. stephanopoulos (1986), Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 829-835.
17. Eikneier, H. and H. J. Rehm (1987) Stability of Ca-alginate during citric acid production of immobilized *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 105-111.
18. Cimburkova, E., J. Zima, J. Novak, and Z. Vanek (1988), Nitrogen regulation avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* in a chemically defined, *J. Basic Microbiol.* **28**, 491-499.
19. Demain, A. L. and N. A. Solomon (1986), Substrates for Large-scale fermentations, *Manual of Industrial Microbiology*, 130-131.
20. Miyake, J., Y. Asada, and S. Kawamura (1989), Nitrogenase In: O. Kitani and C. W. Hall Eds., Biomass handbook, New York, Gordon and Breach Science Publishers, 362-370.
21. Jones, D. T. and D. R. Woods (1986), Acetone-butanol fermentation revisited, *Microbiol. Rev.* **50**, 484-524.
22. Zajic, J. E., N. Kosaric, and J. D. Brosseau (1978), Microbial production of hydrogen, In A. Vol. 9. Fiechter Eds, *Advances in Biochemical Engineering*, pp57-109, Springer-Verlag, Berlin.