

Review

단세포성 해양남세균 종주를 이용한 광생물학적 수소생산 기술

박종우 · 김재만 · 이원호*
군산대학교 해양학과

Current Status of Photobiological Hydrogen Production Technology Using Unicellular Marine Cyanobacterial Strains

JONG WOO PARK, JAE MAN KIM AND WONHO YIH*

Department of Oceanography, Kunsan National University, San 68, Miryong-dong, Kunsan 573-701, Korea

광생물학적 수소생산 잠재력을 가진 다양한 미소생물 가운데, 남세균은 21세기의 수소경제 시대에 적합한 생물군으로 오랫동안 알려져 왔다. 광생물학적으로 수소에너지를 생산하게 될 경우, 해양 단세포성 질소고정 남세균은 남세균류의 하부 분류군들 가운데 가장이상적인 종류의 하나로 평가되고 있다. 단세포성 질소고정 남세균을 이용한 수소생산 기술을 개발하기 위해 반드시 고려해야 할 3가지 사항은 1) 자연계에 존재하는 최우수 수소생산 종주의 확립 2) 광생물학적 수소생산을 뒷받침하는 종주-특이적 최적조건의 탐색 3) 유전학적 방법을 이용한 수소생산 종주의 개량 등이다. 본고에서는 광생물학적 수소생산기술의 상업화를 향한 최근의 연구·개발 추세를 돌아보고, 해양 단세포성 남세균 종주를 이용한 광생물학적 수소생산 기술 분야에서 한국의 세계선도적 지위 확보를 위해서는 향후 10-15년간 집중적인 연구·개발이 절실함을 제안하고자 한다.

Among various microscopic organisms producing photobiological hydrogen, cyanobacteria have long been recognized as the promising biological agents for hydrogen economy in 21 century. For photobiological production of hydrogen energy, marine unicellular N₂-fixing cyanobacteria have been evaluated as an ideal subgroup of Cyanophyceae. To develop the hydrogen production technology using unicellular N₂-fixing cyanobacteria, 3 important factors are pre-requisite: 1) isolation of the best strain from marine natural environment, 2) exploration on the strain-specific optimal conditions for the photobiological hydrogen production, and finally 3) application of the molecular genetic tools to improve the natural ability of the strain to produce hydrogen. Here we reviewed the recent research & development to commercialize photobiological hydrogen production technology, and suggest that intensive R&D during next 10-15 years should be imperative for the future Korean initiatives in the field of the photobiological hydrogen production technology using photosynthetic marine unicellular cyanobacterial strains.

Keywords: Photobiological Hydrogen Production, Unicellular Marine Cyanobacteria, Strain Specificity, N₂-Fixation, Hydrogen Economy

서 론

인류는 1970년대 이래 반복되는 ‘에너지 위기’를 겪으면서, 화석연료 자원의 한계(윤, 2002)를 극복하기 위한 다양한 방안을 강구하고 있다. 이와 함께, 화석연료의 사용에 따라 배출되는 이산화탄소로 인한 ‘전 지구적 온난화 문제’에 대처하기 위해, 비탄소성 에너지(non-carbon energy)를 생산하기 위한 연구를 계속하고 있다(Das and Veziroglu, 2001). 다양한 비탄소성 에너지 가운데 수소는 사용 후의 청정성과 에너지 발생의 순발성 등의 장점으로 인해, 현재의 일반적인 에너지 수요뿐만 아니라(Logan *et al.*, 2002)

초고속 여객기 및 미래형 우주로켓 등의 다양한 미래 기술·산업분야에서도 그 수요가 막대할 것으로 기대되는 21세기적인 에너지로 알려져 있다(Levin *et al.*, 2004; Winter, 2004).

다양한 방법으로 수소를 생산할 수 있으나, 미소생물의 대사와정을 통한 수소(=바이오-수소, Bio-hydrogen)의 생산은 매우 친환경적이며 재생산적 기술로 평가되어 왔다(Hansel and Lindblad, 1998). 바이오-수소를 생산할 수 있는 미소생물은 크게 세 종류로 구분된다. 기질로 제공된 유기물을 혐기성 환경에서 발효하는 과정에서 수소를 생성하는 혐기성 종속영양세균(anaerobic heterotrophic bacteria), 물을 광분해하여 수소와 산소를 생성할 수 있는 광합성 기구(photosynthetic apparatus)를 가진 광합성 미소조류(photosynthetic micro-algae), 그리고 혐기성 환경에서 유기물

*Corresponding author: ywonho@kunsan.ac.kr

과 빛 에너지를 병렬적으로 이용하여 부산물인 수소를 생성하는 광영양 혐기성세균(phototrophic anaerobic bacteria) 등의 미소생물 종류가 그것이다(Asada and Miyake, 1999). 이 가운데 혐기성 세균을 이용한 두 종류의 수소생산 방법은 반응시스템이 엄격하게 혐기조건으로 유지되어야 한다는 제약(김, 2005)과 함께 수소생산과 더불어 기질로 제공된 유기물 유래의 이산화탄소가 발생된다는 환경청정성 측면의 문제(Levin *et al.*, 2004)를 내포하고 있다. 그러나 대도시의 인구집중에 따라 과잉 배출되는 유기성 폐기물을 방치할 경우, 결국에는 지구온난화의 일부 원인이 되는 이산화탄소가 발생될 수밖에 없다는 점을 고려하면, 이 유기성 폐기물로부터 일차적으로 수소에너지를 얻는 것은 화석에너지의 추가적인 수요를 감축시킬 수 있다는 논리적 타당성을 띠고 있다. 광합성 미소조류의 광합성기구를 통한 물의 광분해 산물로서 수소를 생산(비혐기성 광생물학적 수소생산)하는 기술은 재생산성(Hallenberck and Benemann, 2002), 친환경성(Miyake *et al.*, 1999), 그리고 청정성(Madamwar *et al.*, 2000) 등이 뛰어나며, 향후 10-15년 내에 상업화가 가능한(이 기간 중 단위 세포배양액 용적 당 수소생산량이 현재에 비해 3-5배로 향상되는 경우) 가장 이상적인 기술로 평가받고 있다(Wunschiers and Lindblad, 2002). 따라서 이 기술이 상업화 단계에 도달하려면, 미소조류의 광생물학적 수소생산 효율의 향상에 필요한 원천적 기술 요소들을 추론하고, 결정된 각각의 기술 요소에 대한 응용성 높은 기술 수준을 확보할 필요가 있다.

본고에서는 미소조류의 광생물학적 수소생산 상업화를 위한 우수 미소조류 군으로서 단세포성 해양남세균류를 선정하고, 이들의 1) 우수종주의 확보, 2) 종주 특이적 최적 수소생산 조건 탐색 및 3) 유전공학적 기법을 적용한 천연종주의 수소생산능 개선 등 세 가지의 원천적 기술 요소들을 제시하고, 이들 각각에 대한 실현 가능성에 대하여 논의하고자 한다.

광생물학적 수소생산을 위한 미소조류

미소조류를 이용한 광생물학적 수소의 생산은 미소조류 세포의 색소체에 도달한 태양빛에너지가 생화학적 환원 에너지로 변환되어 일어나는 수소의 순생산 세포반응에 의한 것이다(Venjak-Novakovic *et al.*, 2005). 미소조류를 이용한 수소생산은 광생물학적 수소생산 방법 가운데 처음으로 시도된 것으로서, 1942년 Gaffron 등이 녹조류(green algae)를 반응생물로 한 미소조류의 수소생산 현상과 기작에 대해 처음으로 보고하였다(Gaffron and Rubin, 1942). 수소생산 잠재력을 가진 종류가 포함된 미소조류에는 녹조류(green algae)와 남세균(cyanobacteria) 등의 두 가지 분류군이 있으며, 녹조류에 비해 남세균의 수소생산 능이 더 우수한 편이다. 그러나 현재의 광생물학적 수소생산 기술이 상업적 생산에는 크게 미흡한 수준에 머물러 있어, 실용기술의 개발을 위한 원천적인 연구가 필요한 단계이다(Benemann, 2000).

녹조류를 이용한 광생물학적 수소생산 방법은 태양광을 에너지 원으로 물을 분해하여 수소를 생산하는 순반응에 수소효소(hydrogenase)가 작용하는 원리를 응용한 것이다(Gaffron and Rubin, 1942; Park *et al.*, 2005). 녹조류 세포의 광생물학적 수소생산 반응은 한 단계로 되어 있어 그 과정이 간단하나, 수소효소가 저능

도의 산소에 대해 극도의 예민성을 나타내므로 지속적인 수소생산에는 적합하지 않다(Ghirardi *et al.*, 2000). 즉, 녹조류의 광생물학적 수소생산 반응은 초기의 1-3분을 초과하면 극소량의 산소 발생과 동시에 정지하며, 이 때 녹조류가 생산한 수소의 양은 대부분 반응용기 속 기체 용적의 1%를 초과하지 못한다(Asada and Miyake, 1999). 녹조류의 이와 같은 단점을 극복하기 위해, 돌연변이 녹조류 세포의 유도와 수소효소의 산소내성 향상에 관한 연구가 시도되고 있다(Homann, 2003). 남세균 세포 내의 광생물학적 수소 생성은 시/공간적으로 격리된 두 단계의 반응을 거쳐 일어난다. 일차로, 명주기(light cycle)에는 광합성 기구에서 물을 분해하여 산소를 발생하고 이산화탄소를 환원시켜 탄수화물을 생성한다. 이 경우에는 세포 속이 산화환경으로 유지되어, 수소효소의 반응이 억제된다. 암주기(dark cycle)에 일어나는 이차 반응에서는 탄수화물과 질소고정효소(nitrogenase) 및 수소효소가 함께 반응하여 수소와 이산화탄소가 생성된다(Mitsui, 1992; Miyake *et al.*, 1999). 질소고정효소는 남세균의 수소생산을 좌우하는 주요 효소로써 N_2 를 NH_3 로 환원하는 과정에서 수소를 생성하게 되므로(Turner *et al.*, 2001), 질소고정 능력이 우수한 남세균은 다른 종들에 비해 수소생산 잠재력이 더 크다 할 수 있다(Mitsui, 1976; Yih *et al.*, 1996). 또한 남세균 가운데는 극한 환경에 대한 내성을 가진 종류들이 많아, 적정 남세균 종주를 활용할 경우, 매우 다양한 조건에서 수소를 생산할 수 있는 시스템을 구축할 수 있다.

단세포성 해양남세균을 이용한 수소생산 기술

우수 종주의 확보

해양남세균을 이용한 광생물학적 수소생산의 효율성과 활용성의 극대화를 위해 여러 가지 연구가 진행되고 있으며(Luo *et al.*, 1998; Tamagnini *et al.*, 2000), 그 가운데 가장 근본적인 것은 수소생산 능력이 우수한 천연종주를 확보하는 것이다(박, 2007). 수소생산 우수종주의 확보를 위해서는 해양남세균의 생물학적, 생태생리적 특성과 같은 기초과학적 이해가 우선적으로 요구되며, 세부 분류군 별로 다르게 나타나는 광생물학적 수소생성 원리의 다양성을 응용할 수 있는 기술적 직관이 필요하다(Alman and Boger, 1998). 남세균은 전 세계 해양 어느 곳이나 널리 분포할 뿐만 아니라, 온천, 사막, 바위, 나무 등의 건조한 환경에서도 서식하는 등 매우 강한 적응력을 나타낸다. 이런 특징으로 인해 남세균은 광생물학적 수소생산을 위한 이상적인 반응생물인 동시에 어느 환경에서든지 쉽게 종주로 확립할 수 있는 장점을 가진 특별한 생물소재라 할 수 있다. 또한 남세균은 원핵생물의 세포체제를 유지하고 있으나, 세포 대사에서 진핵성 식물의 광합성 유형인 산소발생 광합성(oxygenic photosynthesis)이 주된 영양유형이어서, 원핵생물과 진핵생물의 중간적인 위치에 있는 특이한 생물이기도 하다.

해양남세균 중 기체질소를 고정하는 종류(N_2 -fixers)는 해수 중의 질소이온(NH_4^+ , NO_3^- 등)의 농도에 의한 제한을 덜 받는다(Gao and McKinley, 1994). 해양남세균은 형태적으로 사상체성(filamentous)과 단세포성(unicellular)으로 구분되며, 사상체성 남세균은 또 다시 질소고정 공간인 이형세포를 가지는(heterocystous) 종과 가지지 않는(non-heterocystous) 종으로 세분된다. 단세포성 남세균에

는 이형세포가 없으나, 이들 중에도 질소를 고정하는 종이 있다 (Mitsui *et al.*, 1986). 이와 같이 질소고정 능력을 가진 해양남세균 종류들 중에서 단세포, 단순 사상체, 이형세포-사상체 등의 다양한 형태적 특징을 찾아 볼 수 있으며 (Dutta *et al.*, 2005), 각각의 유형별로 서로 다른 생존전략을 나타낸다. 사상체성 남세균은 광합성을 통해 획득한 탄수화물 및 환원력을 이형세포 및 이와 연결되어 있는 모든 영양세포들과 함께 이용한다. 이런 점에서 단세포성 남세균은 세포 당 활용할 수 있는 탄수화물 및 환원력의 양이 사상체성 남세균에 비해 더 많아져 (Dutta *et al.*, 2005), 질소고정 능력과 질소고정 효소의 활용성이 더 높다는 장점을 가진다 (Colon-Lopez *et al.*, 1997).

광생물학적 수소생산 연구에 활용되고 있는 질소고정 남세균 종주 중에도 사상체성 (Kumazawa and Mitsui, 1981; Lichtl *et al.*, 1997; Shah *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2006)과 단세포성 두 가지가 모두 포함되어 있다. 또한 사상체성 남세균 종주에서도 이형세포를 가지는 종류 (*Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* 속 등)와 가지지 않는 종류 (*Oscillatoria* 속 등)가 있다. 단세포성 종주 가운데 질소고정 능이 있는 종류들 (*Cyanothece*, *Gloebacter*, *Gloeocapsa*, *Microcystis*, *Phaeocystis*, *Synechococcus* 속 등)을 이용한 수소생산 연구가 진행되고 있는 실정이다 (Chin *et al.*, 2004; Colon-Lopez *et al.*, 1997; Kumazawa and Mitsui, 1994; Meunier *et al.*, 1998). Kumazawa와 Mitsui(1994)는 대서양의 Bahama 해역 내만에 서식하는 남세균 종주 *Synechococcus* sp. Miami BG043511로 확보하여, 최고 12 ml H₂·ml(suspension)⁻¹·12 h⁻¹의 광생물학적 수소생산을 확인하여, 단세포성 남세균의 우수한 수소생산 잠재력을 입증한 바 있다 (Yih *et al.*, 1996). 서해 태안반도 연안역에서 분리한 단세포성 남세균 종주인 *Cyanothece* sp. KNU CB-MAL031(박, 2007) 및 미동정 단세포 남세균 종주 KNU CB-MAL058(김, 2008) 등을 이용한 광생물학적 수소생산 잠재력이 Miami BG043511 종주에 근접한다는 결과가 발표되어, 온대 연안역 기원 종주에서도 단세포성 남세균의 우수한 수소생산능을 시사하였다 (Park *et al.*, 2007; 박 등, 2008).

종주-특이적 수소생산 조건의 최적화

해양남세균을 이용한 광생물학적 수소생산 연구에서 가장 근본적인 것은 자연계에 존재하는 보다 우수한 천연종주 확보를 위해 지속적으로 노력하는 것이다 (Mitsui *et al.*, 1986; 박, 2007; 김 2008). 그러나, 매 연구시점에서 활용이 가능한 최선의 종주에 대한 최상의 수소 생산을 위한 종주-특이적 최적 조건을 규명-응용하는 것은 두 번째로 중요한 일이다. 탐색 대상이 되는 최적조건의 유형은 남세균 세포의 생리·생화학적 특성과 관련된 생물학적 조건과 개체군의 변동을 좌우하는 요인인 비생물학적 조건(수온, 염분, pH, 광주기, 희소영양염, 배양액 조성 등; Berberoglu *et al.*, 2008)의 두 가지로 구분할 수 있다. 최종적인 종주-특이적 수소생산 조건의 최적화는 실험 개체군의 지속적인 수소생산을 위한 비생물학적 요소와 생물학적 요소를 해당 종주에 부합하는 구조로 최적 조합한 상태라 할 수 있다.

이러한 최적화 시도의 일례로 개체군 구성 세포의 세포주기 동조화 기법(synchronization of cell cycle)을 들 수 있다 (Park *et al.*, 2009, Mitsui and Kumazawa, 1988). 질소영양염이 결핍된 환

경에서 질소고정능이 있는 단세포성 해양남세균은 산소발생광합성으로 탄수화물을 동화하고(산화 환경), 산소에 극히 예민한 질소고정효소를 이용하여(환원 환경) 질소영양을 충족시킨다. 이와 같이 상호 배제적인 두 가지의 대사작용이 단일 세포내에서 안정적으로 유지되려면, 두 가지 대사작용이 서로 다른 시간대에 진행되는 수밖에 없다 (Wyatt and Silvey, 1969; Gallon 1981). 따라서, 단세포성 남세균의 수소생산을 좌우하는 질소고정효소의 활성을 극대화하여 이를 효율적으로 응용하려면, 개체군 내의 모든 세포가 동일한 세포주기점에 위치하도록(synchrony) 개체군을 조절할 필요가 있다 (Borodin *et al.*, 2002). 이 처럼 남세균 개체군의 세포주기를 인위적으로 조절하여 모든 세포가 동시에 산소발생 조건 또는 수소생산 조건에 있도록 처리하는 시스템을 “동조화 시스템”(synchronization system)이라 한다 (Leon *et al.*, 1986). 해양 단세포성 남세균을 이용한 광생물학적 수소생산을 위한 동조화 시스템에 관한 연구는 Mitsui 등(1986)에 의해 처음으로 시도되어, 그 이전의 “원핵생물에는 일주 시계가 없다”는 통설을 반전시키는 계기가 되었다 (Roenneberg and Marrow, 2005). 세포주기 동조화와 병행하여 질소고정효소의 활성을 추가적으로 제고하는 방법으로, 소량의 CO₂ 또는 CO(Kumazawa, 2003)를 배양용기에 주입하여 ATP 생성을 촉진하거나 산소가 질소고정효소와 반응하여 효소활성을 저해하는 것을 억제하면(Kumazawa, 2003) 수소생산이 더욱 향상될 수도 있다.

동조화 시스템 및 이와 병렬적으로 적용이 가능한 각 종의 대사조절 기법은 남세균 종주마다 서로 달라질 수 있으므로, 각 종주별로 특이적인 수소생산 최적 시스템을 탐색·구축할 필요가 있다 (Golden *et al.*, 1997). 즉, 각 종주별로 최적의 동조화 시스템을 구축하기 위하여, 최적의 세포농도, 수온, 염분, pH, 광 조건(광도, 광질 및 명암 주기), 배양액 조성 등을 탐색·조합해야 한다 (Evans *et al.*, 2004; Greenbaum *et al.*, 2001; Sode *et al.*, 1991; Szacilowski *et al.*, 2005).

유전공학적 기법을 적용한 우수 수소생산 종주의 성능 개선

자연계에 존재하는 최우수 천연종주를 확보하여 최상의 수소 생산을 위한 종주-특이적 최적 조건을 확립한 이후, 최종적으로 시도할 수 있는 세 번째로 중요한 일은 유전공학적 기법을 적용한 천연종주의 인공적인 개량이다. 유전공학적 기법은 우수한 수소생산 천연종주의 수소생산에 관여하는 유전자를 조작하여, 질소고정효소의 활성을 높이거나 (Schuts *et al.*, 2004), 질소고정효소의 산소에 대한 내성을 제고하는 (Masukawa *et al.*, 2002) 방법 등을 말한다. 또한, 생산된 수소를 수소이온으로 변환시키는 수소소비효소(uptake hydrogenase)의 활성을 억제하기 위한 유전 공학적 연구도 (Iwasaki and Kondo, 2000; Sakurai *et al.* 2008)진행되고 있다. 또한 단위 세포내 색소체 수의 비를 낮추어 세포의 광이용 효율을 증대시키려는 유전공학적인 연구를 수행하고 있다 (Chen *et al.*, 2005; Johnson and Golden, 1999). 이와 관련하여, 산소발생성 광합성 남세균은 아니지만, 혐기성 광영양 세균인 *Rhodobacter sphaeroides* KD131의 인공적인 수소소비효소 돌연변이 종주를 이용한 수소생산력 개선에 관한 최근의 보고 (Kim *et al.*, 2006)는 광생물학적 수소 기술개발 분야에서 수소생산 유전공학적 기법의 유용성을 입증하였다 할 수 있다.

결 론

다가오는 수소경제 시대에 우리나라가 국제 경제적 우위를 선점하기 위하여, 보다 친환경적이고 경제적인 수소에너지 확보 전략을 수립해야 한다. 해양남세균을 이용한 광생물학적 수소생산 기술은 이러한 미래전략의 핵심적 원천요소 중의 하나이며, 이러한 기술의 세계 선도적 실용화를 위해서는 다음과 같은 과학기술적 노력이 선행되어야 한다. 이와 같은 선결 조건을 충족할 경우, 향후 10-15년 사이에 광생물학적인 수소생산을 통한 수소에너지의 대규모 상업화가 가능할 것으로 예상된다(Herzog and Tatsutani, 2005).

- 1) 수소생산 잠재력이 탁월한 해양 단세포성 남세균의 천연 종주 확보
- 2) 우수 천연 종주 각각에 대한 종주-특이적 수소생산 조건의 최적화 기술 확보
- 3) 유전공학적 기법을 적용한 우수 수소생산 천연종주의 인공적인 개선기술 확보

사 사

본 논문은 한국해양수산기술진흥원 ‘08해양생명자원 기탁등록 기관 지원사업, “생태독성 해양 원생동물 은행 구축”(2008-2011: R20800408H010000110) 및 에너지관리공단 신재생에너지기술개발 학술진흥과제, “바이오수소 생산능을 가진 미소조류 종주의 확립 및 최적 수소생산 조건 연구”(2005-2007: N-WA03-P-01) 등의 지원비로 수행되었습니다. 초고를 세심하게 가다듬어 주신 군산대학교 박종규 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

- 김미선, 2005. 생물학적인 방법에 의한 수소생산. 수소에너지 정보 제 10호, 수소에너지 사업단. pp. 1-14.
- 김재만, 2008. 한국 연안산 질소고정 남세균 종주들의 세포주기 동조화와 광생물학적 수소생산능력. 군산대학교 대학원. 석사학위논문. 52 pp.
- 박종우, 2007. 한국 연안산 남세균 종주들의 광생물학적 수소생산능력. 군산대학교 대학원. 석사학위논문. 53 pp.
- 박종우, 김재만, 박장호, 이원호. 2008. 국내 연안산 남세균 종주의 수소생산능 최적화: 1. 최적 수소생산을 위한 적정세포 농도. 2008년도 한국해양과학기술협의회 공동학술대회 초록집(발표명, BP-23). 서귀포, 제주, p. 198.
- 윤순진, 2002. 지속가능한 발전과 21세기 에너지 정책 - 에너지 체제 변환 및 필요성과 에너지정책의 바람직한 전환방향. 한국행정학보 36(3), 147-167.
- Almon, H., P. Boger, 1998. Hydrogen metabolism of the unicellular cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis* ATCC29380. *FEMS Microbiol Lett.*, **49**: 445-449.
- Asada Y., J. Miyake, 1999. Photobiological hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**(1): 1-6.
- Benemann, J.R., 2000. Hydrogen production by microalgae. *Journal of Applied Phycology*, **12**: 291-300.
- Berberoglu, H., J. Jay, L. Pilon, 2008. Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**: 1172-1184.
- Borodin, V.B., K.K. Rao, D.O. Hall, 2002. Manifestation of behavioural and physiological functions of *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 in a photobioreactor. *Marine Biology*, **140**: 455-463.
- Chen, M., R.G. Hiller, C.J. Howe, A.W.D. Larkum, 2005. Unique origin and lateral transfer of prokaryotic chlorophyll-b and chlorophyll-d light-harvesting systems. *Molecular Biology and Evolution*, **22**(1): 21-28.
- Chin, W.C., V.M. Orellana, I. Quesada, P. Verdugo, 2004. Secretion in unicellular Marine phytoplankton: demonstration of regulated exocytosis in *Phaeocystis globosa*. *Plant Cell Physiol.*, **45**(5): 535-542.
- Das, D., T.N. Veziroglu, 2001. Hydrogen production by biological process: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, **26**: 13-28.
- Dutta, D., D. De, S. Chaudhuri, S.K. Bhattacharya, 2005. Hydrogen production by cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, **4**: 36.
- Evans, B.R., H.M. O'Neill, S. A. Hutchens, B.D. Bruce, E. Greenbaum, 2004. Enhanced photocatalytic hydrogen evolution by covalent attachment of plastocyanin to photosystem I. *Nano letters*, **4**(10): 1815-1819.
- Gaffron, H., J. Rubin, 1942. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J Gen. Physiol.*, **26**: 219-240.
- Gallon, J.R., 1981. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. *Trends in Biochemical Sciences*, **6**: 19-23.
- Gao, K., K.R. McKinley, 1994. Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: a review. *J. Appl. Phycol.*, **6**: 45-60.
- Ghirardi, M.L., L. Zhang, J.W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum, A. Melis, 2000. Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, **18**(12): 506-511.
- Golden, S.S., M. Ishiura, C.H. Johnson, T. Kondo, 1997. Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**: 327-354.
- Greenbaum, E., S.L. Blankinship, J.W. Lee, R.M. Ford, 2001. Solar photobiochemistry: simultaneous photoproduction of hydrogen and oxygen in a confined bioreactor. *J. Phys. Chem. B*, **105**: 3605-3609.
- Hallenberck, P.C., J.R. Benemann, 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting process. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**: 1185-1193.
- Hansel, L.A., P. Lindblad, 1998. Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **50**: 153-160.
- Herzog, A., M. Tatsutani, 2005. A hydrogen future? An economic and environmental assessment of hydrogen production pathways. *Natural Resources Defense Council*, 23 pp.
- Homann, P.H., 2003. Hydrogen metabolism of green algae: discovery and early research - a tribute to Hans Gaffron and his coworkers. *Photosynthesis Research*, **76**: 93-103.
- Iwazaki, H., T. Kondo, 2000. The current state and problems of cir-

- cadian clock studies in cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology*, **41**(9): 1013–1020.
- Johnson, C.H., S.S. Golden, 1999. Circadian programs in cyanobacteria: Adaptiveness and mechanism. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**: 389–409.
- Kim, M.S., J.S. Baek, J.K. Lee, 2006. Comparison of H₂ accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant, *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**: 121–127.
- Kumazawa, S., 2003. Photoproduction of hydrogen by the marine heterocystous cyanobacterium *Anabaena* species TU37-1 under a nitrogen atmosphere. *Mar. Biotechnology*, **5**: 222–226.
- Kumazawa, S., A. Mitsui, 1981. Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by a saltwater blue-green alga, *Oscillatoria* sp. Miami BG7. I. Enhancement through limiting the supply of nitrogen nutrients. *International Journal of Hydrogen Energy*, **6**: 339–348.
- Kumazawa, S., A. Mitsui, 1994. Efficient hydrogen photoproduction by synchronously grown cells of a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Miami BG 043511, under high cell density conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, **44**: 854–858.
- Leon, C., S. Kumazawa, A. Mitsui, 1986. Cyclic appearance of aerobic nitrogenase activity during synchronous growth of unicellular cyanobacteria. *Current microbiology*, **13**: 149–153.
- Levin, D.V., L. Pitt, M. Love, 2004. Biohydrogen production : prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**: 173–185.
- Lichtl, R.R., M.J. Bazin, D.O. Hall, 2005. The biotechnology of hydrogen production by *Nostoc flagelliforme* grown under chemostat conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**: 701–707.
- Logan, B.E., S.E. Oh, I.S. Kim, S.V. Ginkel, 2002. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environ. Sci. Technol.*, **36**: 2530–2535.
- Lopez, M.S., D.M. Sherman, L.A. Sherman, 1997. Transcriptional and translational regulation of nitrogenase in light-dark- and continuous-light-grown cultures of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *Journal of Bacteriology*, **179**(13): 4319–4327.
- Luo, Y.H., S. Kumazawa, L.E. Brand, 1998. Effect of exogenous substrates on hydrogen photoproduction by a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Miami BG043511. In: *Biohydrogen*, edited by Zaborsky, Plenum, pp. 219–226.
- Madamwar, D., N. Grag, V. Shah, 2000. Cyanobacterial hydrogen production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **16**: 757–767.
- Masukawa, H., M. Mochimaru, H. Sakurai, 2002. Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**: 618–624.
- Mitsui, A., 1975. The utilization of solar energy for hydrogen production by cell free system of photosynthetic organisms. In: *Hydrogen energy; Proceedings of the Hydrogen Economy Miami Energy Conference, Miami Beach, Fla., March 18-20, Part A.* (A75-44751 22-44) New York, Plenum Press, pp. 309–316.
- Mitsui, A., 1976. Long range concepts; applications of photosynthetic hydrogen production and nitrogen fixation research. In: *Proceedings of a conference on capturing the sun through bioconversion.* March 10-12, Washington, D.C., pp. 653–673.
- Mitsui, A., 1992. Hydrogen photoproduction by marine cyanobacteria for alternating the carbon energy sources. *Short communications of the 1991 International Marine Biotechnology Conference*, vol II, pp. 710–723.
- Mitsui, A., R. Murray, B. Entenmann, K. Miyazawa, E. Polk, 1981. Utilization of marine blue-green algae and macroalgae in warm water mariculture. *Environmental Science Research*, **23**: 215–225.
- Mitsui, A., S. Kumazawa, A. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao, T. Arai, 1986. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, **323**(6090): 720–722.
- Mitsui, A., S. Kumazawa, 1988. Nitrogen fixation by synchronously grown unicellular aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria. In: *Methods in enzymology*, edited by Packer, L. and A.N. Glazer, *Academic Press*, **167**: 484–490.
- Miyake, J., M. Miyake, Y. Asada, 1999. Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion. *Journal of Biotechnology*, **70**: 89–101.
- Park, J.W., J.M. Kim, N. Ha, W. Yih, 2007. Photobiological hydrogen production by Korean strains of unicellular nitrogen-fixing marine cyanobacteria. In: *Proceedings of the 2007 Asian Biohydrogen Symposium.* November 9-11, Daejeon, Korea. p.50.
- Park, J.W., J.M. Kim, N. Ha, W. Yih, 2009. Synchronization of a cultured marine unicellular N₂-fixing cyanobacterium, *Cyanothece* sp. KNU CB-MAL031. *The Yellow Sea* (in press).
- Park, W., S.H. Hyun, S. Oh, B.E. Logan, I. Kim, 2005. Removal of headspace CO₂ increases biological hydrogen production. *Environ. Sci. Technol.*, **39**: 4416–4420.
- Sakurai, H., H. Masukawa, X. Zhang, H. Ikeda, K. Inoue, 2008. Improvement of nitrogenase-based photobiological hydrogen production by cyanobacteria by gene engineering - hydrogenases and homocitrate synthase. In: *Photosynthesis. Energy from the sun: 14th International Congress on Photosynthesis*, edited by Allen, J.F., E. Gantt, J.H. Golbeck, and B. Osmond, Springer, pp. 1277–1280.
- Schuts, K., T. Happe, O. Troshina, P. Lindblad, E. Leitao, P. Oliveira, P. Tamagnini, 2004. Cyanobacterial H₂ production-a comparative analysis. *Planta*, **218**: 350–359.
- Shah, V., N. Garg, D. Madamwar, 2001. Ultrastructure of the water cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production. *FEMS Microbiology letters*, **194**: 71–75.
- Sode, K., K. Horikoshi, H. Takeyama, N. Nakamura, T. Matsunaga, 1991. On-line monitoring of marine cyanobacterial cultivation based on phycocyanin fluorescence. *Journal of Biotechnology*, **21**: 209–218.
- Szaciłowski, K., W. Macyk, A. Drzewiecka-Matuszek, M. Brindell, G. Stochel, 2005. Bioninorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *Chem. Rev.*, **105**: 2647–2694.
- Tamagnini, P., J. Costa, L. Almeda, M. Oliveira, R. Salema, P. Lindblad, 2000. Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. *Current microbiology*, **40**: 356–361.

- Turner, S., T.C. Huang, S. Chaw, 2001. Molecular phylogeny of nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **42**: 181–186.
- Venjak-Novakovic, G., Y. Kim, X. Wu, I. Berzin, J.C. Merchuk, 2005. Air-lift bioreactors for algae growth on flue gas: mathematical modeling and pilot-plant studies, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**: 6154–6153.
- Winter, C.J., 2004. The hydrogen energy economy: an address to the world economic forum 2004. *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**: 1095–1097.
- Wunschiers, R., P. Lindblad, 2002. Hydrogen in education - a biological approach. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27**: 1131–1140.
- Wyatt, J.T., J.K.G. Silvey, 1969. Nitrogen fixation by *Gloeocapsa*. *Science*, **165**: 908–909.
- Yih W, H. Takeyama, A. Mitsui, 1996. Hydrogen photoproduction by the synchronously growth marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. Miami BG 043511 under extremely high oxygen concentration. *J. Korean Soc. Oceanogr.*, **31**(1): 18–22.
- Yoon, J.H., J.H. Shin, M.S. Kim, S.J. Sim, T.H. Park, 2006. Evaluation of conversion efficiency of light to hydrogen energy by *Anabaena variabilis*. *International Journal of Hydrogen Energy*, **31**: 721–727.

2009년 2월 11일 원고접수

2009년 2월 17일 수정본 채택

담당편집위원: 박명길