

통성혐기성 수소생산균주 *Rhodopseudomonas* sp. MeL 6-2를 이용한 수소생산효율에 미치는 포도당 및 자당 농도의 영향

이은영*

수원대학교 환경공학과

Effect on the Concentration of Glucose and Sucrose on the Hydrogen Production using by the Facultative Anaerobic Hydrogen Producing Bacterium *Rhodopseudomonas* sp. MeL 6-2. Lee, Eun Young*.

Department of Environmental Engineering, University of Suwon, Suwon 445-743, Korea – Hydrogen producing bacterium, strain MeL 6-2 was isolated from the sludge of the factory areas in Anyang through the acclimation in basal salt medium (BSM) supplemented with 10 g/L of sucrose. Isolated strain MeL 6-2 was a facultative anaerobe which could grow in both aerobic and anaerobic environments. An aerobically grown pure culture isolated from enriched culture was analyzed by 16S rDNA sequencing and identified as *Rhodopseudomonas* sp. MeL 6-2. Effects of the concentrations of glucose and sucrose on the hydrogen production rate and the hydrogen production yield were investigated. When glucose in the range of 1~12 g/L was supplemented to the BSM, strain MeL 6-2 could grow without lag phase. An increased glucose concentration increased the specific hydrogen production rate linearly to 4.2 mmol-H₂·L⁻¹·h⁻¹ at 10 g/L, and 60 mmol-H₂·mg-DCW⁻¹·h⁻¹, but decreased slightly as the concentration increased to 12 g/L. The hydrogen production yield was maintained over a range from 2.6 to 3.1 mol-H₂·mol-glucose⁻¹. When sucrose in the range of 1~12 g/L was supplemented to the BSM, strain MeL 6-2 could grow after ten hours. An increased sucrose concentration increased the specific hydrogen production rate and the hydrogen production yield to 16 3mmol-H₂·mg-DCW⁻¹·h⁻¹ and to 4.5 mol-H₂·mol-sucrose⁻¹, respectively.

Key words : Bio-hydrogen, facultative anaerobes, glucose, sucrose

서 론

최근 하수처리장을 통한 폐수처리 시 가장 큰 문제점은 악취 및 잉여슬러지의 재처리이며, 이에 대한 비용은 하수처리장 전체 운전비용의 약 50% 이상을 차지하는 것으로 보고되고 있다[16]. 2005년 재활용비율이 10%인 실정에서 2011년 이후 발생 전량을 육상 처리해야 하는 실정에 맞추어 슬러지의 재활용 비율을 64%로 목표치를 잡고 있다[16]. 특히, 최근 들어 슬러지를 감량화하거나 자원화를 통한 폐기물의 발생량을 최소화시키려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 폐 활성슬러지는 단순 폐기물이 아닌 유기성 자원으로서 biosolid로 이용하여 에너지를 생산할 경우, 폐기물의 감량화가 아닌 적극적인 대체에너지원으로서의 활용할 수 있다. 최근 많은 연구가 이루어지는 기술 중 하나가 슬러지를 이용하여 청정에너지인 수소를 생산하는 것이다. 슬러지를 단독으로 이용하거나, 음식 폐기물이나 축산 폐기물을 병합 처리하는 방법도 이용되고 있다. 이는 슬러지를 이용한 수

소 생산에서 유기물 함량이 다소 부족할 수 있기 때문에 유기물을 보충하기 위함이다. 수소는 연소할 때 물만 생성되는 청정에너지로서 재생가능하고, 122 KJ/g의 높은 에너지 효율로 인하여 기존의 주요 에너지원인 화석연료를 대체할 수 있는 대체에너지로서의 가능성이 높은 물질이다[23]. 수소를 에너지원으로 이용할 경우 물과 유기물질의 구성성분으로부터 제조될 수 있으므로 원료물질의 고갈 위험이 적고, 단위 중량당 에너지 밀도가 높은 고밀도 에너지(가솔린의 3배)이다. 수소생산 공정은 크게 화학적 생산, 및 생물학적 생산이 가능하며[24], 현재 상용화되어있는 수소 제조 기술이 주로 석유나 천연가스 등의 화석연료 수증기 개질 반응으로 제조되거나, 원유 정제공정 및 제철소 부생가스에서 분리하거나, 물을 전기분해 하는 등이다. 그러나 이러한 방법들은 주로 천연가스나 원유를 원료로 하는 것으로 대체에너지로서의 개발 목적에 부합하지 않는 기술들이다. 따라서, 대체에너지로서의 수소생산은 궁극적으로는 미생물 등을 이용한 청정기술로서 물이나 유기성 폐자원을 이용한 환경친화적인 기술로 수소를 제조해야한다[8]. 미생물을 이용하여 수소를 생산하는 데는 녹조류가 광합성을 통해 물로부터 수소를 직접 생산하는 물분해 수소생산, 광합성에 의해 유기물을 기질로 혐기적 환경에서 수소생산하는 과정,

*Corresponding author

Tel: 82-031-220-2614, Fax: 82-031-220-2533

E-mail: ley@suwon.ac.kr

Clostridium[4, 6, 7, 9, 19, 21, 32] 및 *Enterobacter*[10, 14, 25, 29]와 *E. coli* [1, 13] 등이 참여하는 암조건에서 유기질을 발효하는 과정에서 수소 및 유기산을 생산하는 과정 등 크게 나눌 수 있다. 이 중 광합성 발효를 통한 수소생산은 홍색 비유황세균, 홍색 유황세균 및 녹색 유황세균에 의해 이루어진다. 광합성 세균에 의한 유기성 폐기물의 처리는 포도당과 같은 당 전환율은 20-30% 가량이며, 유기산의 수소 전환율은 70-80%로 알려져있다. 혐기발효는 절대 및 통성 혐기성 미생물에 의해 혐기성 환경에서 유기성 폐기물을 수소와 유기산으로 전환시켜준다. 이 과정은 빛에 의존하지 않고, 광합성기작의 속도($0.04\sim 0.21 \text{ L-H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)에 비해 수소 생산속도($1.6\sim 26.9 \text{ L-H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)가 빠르기[18] 때문에 장점이 있다. 단점으로는, 유기물로부터 전환효율이 낮으나, 수소 생산속도가 빨라서 상용화에 가장 근접할 수 있는 기술로 평가된다. 생물학적 수소생산은 에너지를 생산하는 기술이며 동시에 환경 처리 기술이 될 수 있다. 미생물 배양에서 혐기발효를 통해 이론적으로 1 mol의 포도당으로부터 2~4 mol의 수소가 발생되지만 발효 중에 생성되는 유기산의 생산율, pH의 변화, 배지내의 유해 물질, 탄소원의 종류, 질소원의 종류 등은 수소 생산에 영향을 준다[5, 22, 26, 30]. 본 연구에서는, 절대 혐기성 수소생산 세균보다 빠르게 생산하는 통성 혐기성 수소 생산균주를 이용하여 고농도의 당이 함유된 유기성 폐기물로부터 수소를 생산하기 위한 탄소원인 포도당과 자당의 최적 농도 조건을 찾아보았다.

재료 및 방법

수소 생성균의 순수 분리 및 배양 조건

수소생성 미생물의 분리를 위하여 멸균된 무기염배지(KH_2PO_4 , 0.5 g/L; MgCl_2 0.5 g/L; NH_4Cl 2.5 g/L; Yeast extract 6 g/L) 80 mL에 최종농도가 10 g/L가 되도록 sucrose(자당)를 첨가한 후 500 mL 혈청병에 넣고, 질소가스로 치환한 후 인양친의 공단 주변 슬러지를 최종 부피(100 mL)의 20%가 되도록 접종하였다. 혈청병을 알루미늄 뚜껑으로 밀봉하고 고무마개에 50 mL 주사기를 꽂아서 35°C 배양기에 백열등을 켜서 정치 배양하면서, headspace(공탑공간) 시료를 채취하여 수소생성량을 분석하였다. 배양하는 혈청병의 수소 생산이 증가하지 않는 시점에 새로운 배지가 함유된 혈청병으로 10%가 되도록 접종하여 주었다. 약 13회 계대 배양한 배양액으로부터 gellan gum을 10 g/L 함유한 무기염 고체배지에 도말하여 약 7종의 미생물을 분리하였다. 그 중 수소 생성효율이 가장 좋고 성장속도가 가장 빠른 MeL 6-2 균주를 선정하였다. 균주의 분자생물학적 동정을 위해서 고체배지에서 배양한 균체를 Bionics에 의뢰하여 16S rDNA sequencing 방법에 의거하여 동정하였다. 이후 CLUSTAL W¹⁶를 사용하여[28], 염기서열을 조합하여 NCBI(The

National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih>)에서 제공하는 Advanced Blast search를 이용하여 Genebank의 염기서열과 비교함으로써 균주의 분자 동정을 하였다.

MeL 6-2 균주를 포도당 및 자당이 10 g/L 함유된 무기염 배지에서 전배양하여 약 2일 배양하였다. 500 mL 혈청병에 45 mL의 멸균된 무기염배지와 포도당 및 자당의 농도를 1~12 g/L로 각각 다르게 설정한 후 균주 배양액을 10%씩 접종하였다. 질소로 치환한 후 35°C 배양기에서 배양하였다. 각 조건은 매 2 set씩 실험하였으며, 5시간 간격으로 시료를 채취하여 OD, 포도당(자당)농도, 및 수소를 측정하였다.

분석조건

MeL 6-2 균주의 세포농도를 측정하기 위하여 배양액을 취한 후 600 nm의 파장에서 spectrophotometer(Agilent 8453, USA)로 OD를 측정한 후, 건조중량으로 환산하였다. 배양액상의 포도당 및 자당의 농도를 분석하기 위하여 배양액을 원심분리(10000 rpm, 5분)한 후 각각 Glucose-E kit (Yeongdong, Korea) 및 Phenol-sulfuric acid 법[12]에 의거하여 분석하였다. 공탑공간 상의 수소를 분석하기 위하여 Molesieve(13×80×100, 6'×1/8' SS, Alltech, USA)와 TCD가 장착된 gas chromatography(Younglin 600D, Korea)로 분석하였다. 오븐, 주입기 및 검출기의 온도는 각각 90, 120, 및 160°C으로 설정하였다.

결과 및 고찰

수소생성균의 선발 및 동정

군포공단 주위 하천변 햇볕이 잘 드는 지역에서 채취된 슬러지를 광·혐기조건으로 13차례 계대 배양하여 붉은 빛의 배양액을 얻고 이를 고체배지에서 순수 분리한 균주 중 생육이 우수한 MeL 6-2균주를 분리하였다. 16S rDNA의 염기서열 분석결과 *Rhodospseudomonas* sp. PSB07-8와 100% 연관성을 가지며, *palustris*는 99%인 균으로 동정되었다. 따라서, 염기서열의 분석만으로 확실한 결론을 내릴 수는 없으나, 분리된 MeL 6-2은 *Rhodospseudomonas* sp.으로 추정된다. *Rhodospseudomonas* sp. 중 *Rps. palustris*는 홍색 비유황세균으로 균체 성장과 수소 생산에 여러 대사(photo-autotrophic, photo-heterotrophic, chemo-autotrophic, chemo-heterotrophic)을 수행하는 것으로 알려져있어[11], 호기적 및 혐기적 암조건에서도 생장이 가능하고, 광합성과 동시에 발효에 의해서도 배양이 가능하다고 한다. 이러한 다양성 때문에 유기산 뿐 아니라 단당류 및 이당류의 기질 이용이 가능하여 다양한 유기성 폐수에 적용이 용이하다고 한다.

포도당의 농도 변화가 MeL 6-2 균주의 수소 생성효율에 미치는 영향

1~12 g/L의 포도당을 함유한 무기염 배지를 넣은 혈청병에 MeL 6-2 균주를 10%가 되도록 접종한 후 5시간 간격으로 시료를 채취하면서 배양액의 OD, 포도당 농도 및 상층부의 공간부분에서의 채취한 공기 중의 수소농도를 측정하였다. 탄소원으로 첨가한 포도당이 1~12 g/L의 모든 범위에서 초기 지체기 없이 성장하였으며, 첨가량이 1~2 g/L인 경우 수소 생성은 균체 건조중량 증가 곡선과 일치하여 20시간까지 증가하다가 더 이상 증가하지 않았다(data not shown). 첨가된 포도당은 배양 시작 약 10시간이 경과될 때까지 거의 사용되지 않다가 이후 급격히 소모되었다(Fig. 1). 8 g/L 이하의 포도당은 첨가량이 모두 사용되었으며, 이는 8 g/L 이하의 포도당은 균주의 성장을 충분히 뒷받침하기에 부족한 기질로 사료된다. 이는 앞서 언급한 것처럼 포도당을 1~2 g/L 첨가한 실험구에서 성장곡선이 20시간 이후 정지된 것에서도 알 수 있다. 반면, 4 g/L의 포도당 첨가구에서는 25시간 이후 성장곡선이 정지되었으며, 포도당 고갈과 일치하는 그래프이다. 나머지 실험구(6~12 g/L)의 성장곡선은 25시간에서 30시간 사이 성장곡선의 둔화가 관찰되었다. 포도당을 10, 12 g/L씩 첨가한 실험구에서는 30시간을 기준으로 각각 62% 및 40%가 분해되었으며, 배양 53

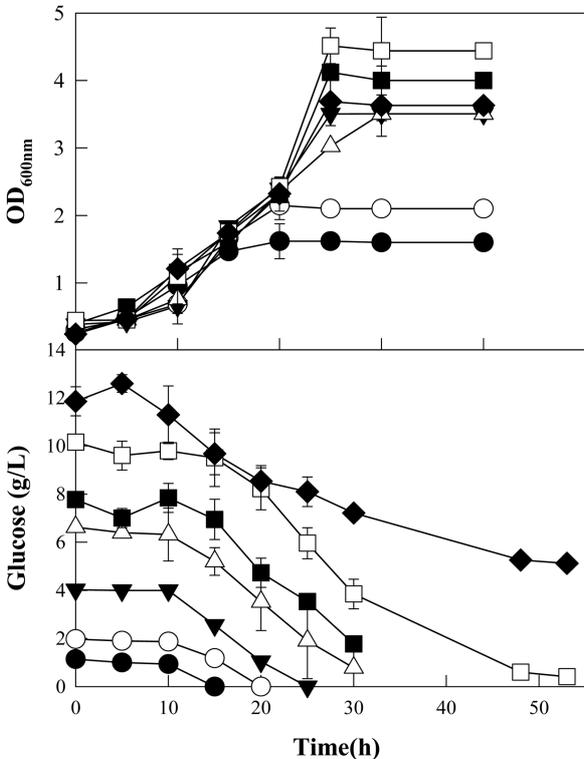


Fig. 1. The glucose consumption profile of *Rhodospseudomonas* sp. MeL 6-2 with various initial concentration of glucose. Glucose (g/L) ●, 1; ○, 2; ▼, 4; ▽, 6; ■, 8; □, 10; ◆, 12.

시간에 각각 96%와 62%의 분해율을 보였다. 이때 포도당 첨가량이 12 g/L의 경우 포도당의 소모가 매우 완만한 경향을 보였으며, 이로서 포도당의 최적 첨가량은 8~10 g/L임을 추정할 수 있다. 대표적으로 포도당이 10 g/L로 첨가된 실험구에서의 균주의 성장곡선을 Fig. 2에 도시하였다(Fig. 2).

포도당의 농도가 4~12 g/L인 경우, 균체량이 더 이상 증가하지 않는 25시간 이후 53시간까지 지속적으로 60~150 mL의 수소가 생성되었다(data not shown). 따라서, 포도당의 농도 증가에 따른 단위시간 및 단위부피당 수소 생산성 ($\text{mmol-H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)의 변화를 알아보았다(Fig. 3). 단위시간 및 단위 부피당 수소 생산성은 포도당의 농도가 증가함에 따라 증가하다가 10 g/L에서 최대값인 $4.2 \text{ mmol-H}_2\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 을 보이

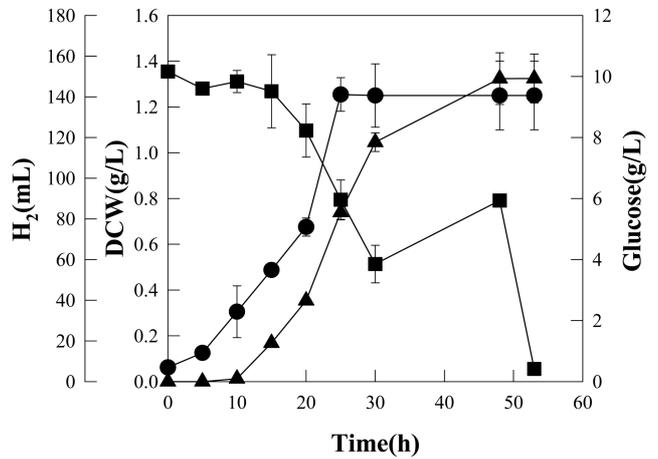


Fig. 2. Growth pattern of *Rhodospseudomonas* sp. MeL 6-2 in MSM (minimal salt medium) supplemented with 10 g/L of glucose. ●, DCW (g/L); ▲, H₂ gas (mL); ■, Glucose (g/L).

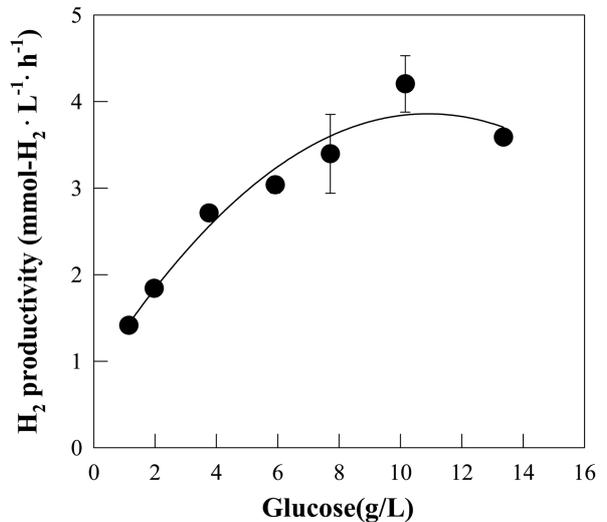


Fig. 3. Effect of the glucose concentration on the hydrogen productivity of *Rhodospseudomonas* sp. MeL 6-2 in MSM.

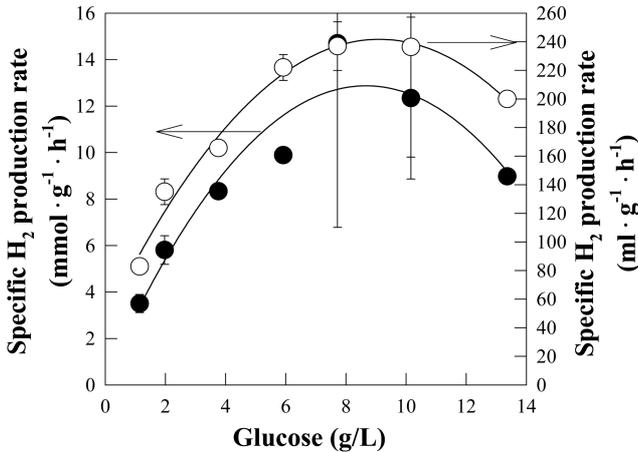


Fig. 4. Effect of the glucose concentration on the hydrogen productivity of *Rhodopseudomonas* sp. MeL 6-2 in MSM.

고 그 이후 다소 감소하는 경향을 보였다. 따라서, 수소생산성은 포도당의 농도가 10 g/L으로 첨가된 경우 최적의 값을 보였다. 또한, 균주의 생육에 따른 수소의 비생산속도를 비교하여보았다(Fig. 4). 포도당 첨가량이 증가할수록 단위 시간 및 단위 세포무게당 비수소생산속도가 지속적으로 증가하여 8 g/L에서 최대값인 14.7 mmol-H₂-g-DCW⁻¹·h⁻¹(239 mL-H₂-g-DCW⁻¹·h⁻¹)을 보이고 이후 10 g/L 이후 점차 감소하였다. Yun 등(2005)[31]의 *Rhodopseudomonas palustris*를 이용한 혐기발효의 결과 배양 144시간 동안 포도당으로부터 2.30 mL-H₂-mg-DCW⁻¹을 생성하며 20%의 수소 전환 효율을 보인 결과에 비교할 경우 본 연구결과는 효율면에서 우수하다 할 것 이다. 또한, *Enterobacter*를 이용한 생물학적 발효에선 포도당이 30 g/L에서 수소의 누적 농도가 431 mL로 최대값을 얻은 것과[15]는 달리 최적 첨가량은 10 g/L의 결과를 얻었다. 미생물의 균체량에 대한 수소생산수율은 포도당의 첨가량에 비례하여 증가되어 0.76~2.46 L-H₂-g-DCW⁻¹의 값을 보였다. 반면에 첨가된 기질인 포도당에 의한 수소생산수율은 2.6~3.1 mol-H₂-mol-glucose⁻¹의 범위였다(Fig. 5). *Clostridium*을 이용한 수소생산수율은 1.08~2.0 mol-H₂-mol-glucose⁻¹의 범위로 보고되어있으며[6, 32], *Enterobacter*를 이용한 수소생산이 1.6~2.1 mol-H₂-mol-glucose⁻¹의 범위[15, 29], *E. coli*를 이용한 경우, 1.2~2.0 mol-H₂-mol-glucose⁻¹으로 보고된 것[1, 13]에 비교하면 상대적으로 우수한 것으로 나타났다. 포도당의 농도가 *Ethanoligenes harbinense* B49의 수소생산수율에 미치는 영향을 알아본 결과 초기 농도 3 g/L에서 9 g/L까지 수율이 증가하여 최대로 1.83 mol-H₂-mol-glucose⁻¹의 값을 보이고 그 이후에 18 g/L까지 첨가된 포도당이 오히려 수율을 감소시키는 것으로 나타났다[20]. 반면, 본 연구에서는, 포도당의 첨가량은 수소 생산 수율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

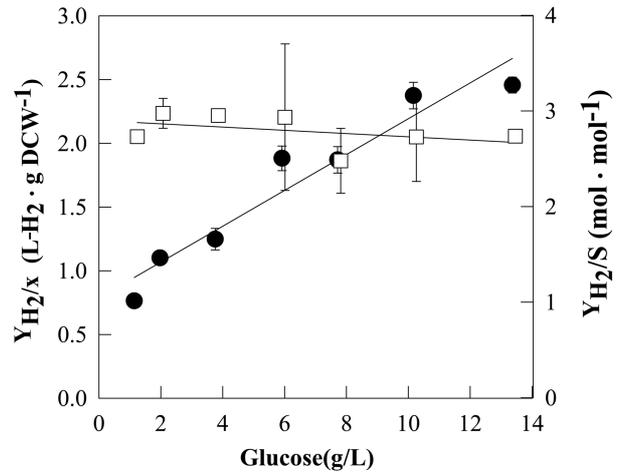


Fig. 5. Effect of the glucose concentration on the hydrogen production yield of *Rhodopseudomonas* sp. MeL 6-2 in MSM. ●, Y_{H₂/X}; □, Y_{H₂/S}.

자당(Sucrose)의 농도 변화가 MeL 6-2 균주의 수소 생성 효율에 미치는 영향

1~12 g/L의 자당을 첨가한 무기염 배지에서 생장하는 MeL 6-2 균주는 포도당에서 생장할 때와는 달리 10시간의 지체기 후 균주의 생장이 시작되었다. 일단 균주의 생장이 개시된 후에는 원활하게 성장하며, 성장시간 및 세포농도는 포도당에서 생장할 때와 유사한 값을 보였다. 1~10 g/L의 자당이 첨가되는 범위에선 첨가량이 증가할수록 수소 생성량이 증가하였으며, 초기 20시간동안의 지체기 후 수소가 생성되어 53시간이 경과한 후 최대로 127 mL가 생성되었다. 8 g/L 이하의 농도로 첨가한 자당은 모두 분해되었지만, 12 g/L로 첨가된 자당은 53시간이 경과한 후 74%만이 분해되

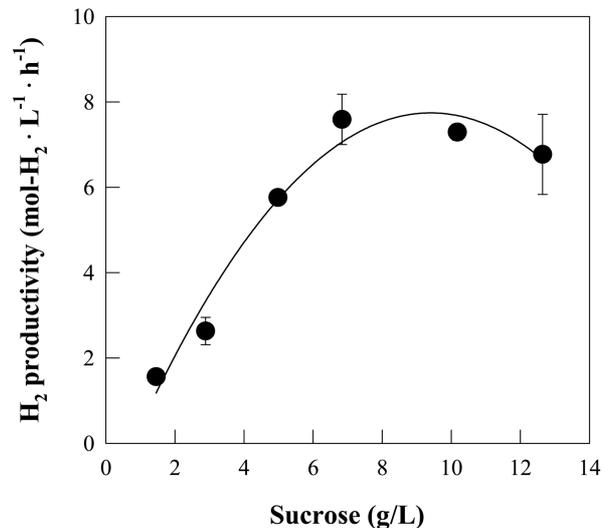


Fig. 6. Effect of the sucrose concentration on the hydrogen productivity of *Rhodopseudomonas* sp. MeL 6-2 in MSM.

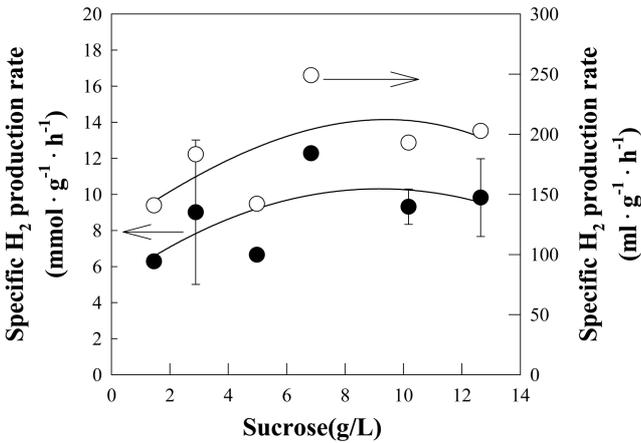


Fig. 7. Effect of the sucrose concentration on the hydrogen production rate of *Rhodospseudomonas* sp. MeL 6-2 in MSM.

어, 120 mL의 수소가 생성되었다. 단위시간 및 단위부피당 수소 생산성은 자당의 첨가량이 증가할수록 증가하였으며, 8 g/L의 농도에서 7.6 mol-H₂·L⁻¹·h⁻¹의 최대값을 보이고, 이후 다소 감소하였다(Fig. 6). 첨가된 자당의 농도가 단위시간 및 단위 세포무게 당 비수소 생산속도에 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 7). 자당 첨가량이 증가할수록 수소 비생산속도가 지속적으로 증가하여 8 g/L에서 최대값인 12.3 mmol-H₂·g-DCW⁻¹·h⁻¹(249 mL-H₂·g-DCW⁻¹·h⁻¹)을 보이고 이후 10 g/L 이후 점차 감소하였다. 이와 같은 경향은 포도당과 자당에서 모두 유사하게 관찰되었다. 자당의 경우, 포도당과 달리 균체량의 증가 및 수소 생산에 있어 초기 지체기를 보이지만 최종적으로 첨가량에 따른 단위시간 및 단위부피당 수소 생산성 및 단위시간 및 단위 세포무게 당 비수소 생산속도는 포도당에 비해 다소 낮으나 유사한 값을 보였다. 163 mmol-H₂·mg-DCW⁻¹·h⁻¹(3664 mL-H₂·mg-DCW⁻¹·h⁻¹)의 최대값을 보였다. 수소 생산수율은 1~12 g/L의 영역에서 3.7~4.5 mol-H₂·mol-sucrose⁻¹로 자당의 첨가량이 증가함에 따라 소량 증가하는 경향을 보였다. 자당을 이용한 기존 수소생산수율을 비교할 경우, 압조건에서 *Clostridium pasteurianum* CH4와 *Microflora*와 광조건인 *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 및 *Rhodobacter sphaeroides* SH2C가 이단계 반응을 통한 수소생성조건에서 각각 14.1 및 6.63 mol-H₂·mol-sucrose⁻¹인 것에 비해 다소 낮은 효율임을 알 수 있다[2, 3, 27]. 그러나 위의 실험값이 단독 광조건 및 혐기조건인 본 연구의 값을 비교할 때 동일한 단순 비교와는 달리 고려해야 한다. 본 연구와 유사한 조건인 회분배양시 *Enterobacter*의 결과에서는 6.0 mol-H₂·mol-sucrose⁻¹의 수율을 보였다 [17].

미생물의 균체량에 대한 수소생산수율은 자당의 첨가량에 비례하여 증가되어 0.87~2.04 L-H₂·g-DCW⁻¹의 값을 보였다. 반면에 첨가된 기질인 포도당에 의한 수소생산수율은

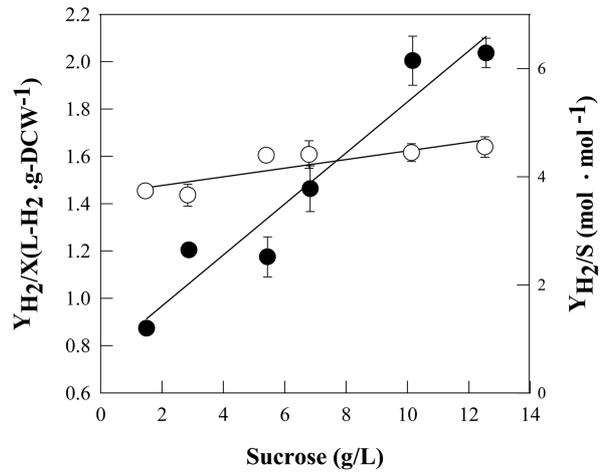


Fig. 8. Effect of the sucrose concentration on the hydrogen production yield of *Rhodospseudomonas* sp. MeL 6-2 in MSM. ●, Y_{H₂/X}; □, Y_{H₂/S}.

3.7~4.5 mol-H₂·mol-sucrose⁻¹의 범위였다(Fig. 8). 즉, 자당의 첨가량은 포도당과 마찬가지로 수소 생산 수율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

또한, 본 연구에서 실험한 포도당과 자당을 포함한 많은 종류의 유기성 폐기물을 대상으로 기질 적합성 혹은 최대 수소생산수율을 얻기 위한 보다 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

안양천 공단 주변 슬러지를 미생물 접종원으로 무기염배지에 10 g/L의 자당을 첨가하여 수소 생산 균주 MeL 6-2을 분리하였다. 분리 균주 MeL 6-2은 호기성조건과 혐기성 조건에서 모두 성장하는 통성 혐기성 균주 *Rhodospseudomonas* sp.였다. 유기성 폐기물 내에 다량 함유되어있는 포도당과 자당의 농도변화가 수소 생산 속도 및 수소 생성효율에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 포도당을 1~12 g/L의 범위로 첨가할 경우 lag phase 없이 성장하였으며, 첨가량이 증가할수록 단위시간 및 단위부피당 수소 생산성이 증가하여, 10 g/L에서 최대값인 4.2 mmol-H₂·L⁻¹·h⁻¹을 보이고 그 이후 다소 감소하는 경향을 보였다. 균체량에 대한 수소생산수율은 0.76~2.46 L-H₂·g-DCW⁻¹의 값을 보였으며, 첨가된 기질인 포도당에 의한 수소생산수율은 2.6~3.1 mol-H₂·mol-glucose⁻¹의 범위였다. 자당을 1~12 g/L의 범위에서 첨가할 경우 약 10시간의 지체기 후 원활한 성장을 보였다. 단위시간 및 단위 세포무게 당 비수소 생산속도는 및 수소 생산수율은 자당의 첨가량이 증가할수록 증가하여 각각 163 mmol-H₂·mg-DCW⁻¹·h⁻¹ 및 4.5 mol-H₂·mol-glucose⁻¹의 최대값을 보였다.

REFERENCES

1. Bisaillon, A., J. Turcot, and P. C. Hallenbeck. 2006. Hydrogen production by continuous cultures of *Escherichia coli* under different nutrient regimes. *Int. J. Hydrogen Energy* **33**: 1465-1470.
2. Chen, C. Y., W. B. Lu, C. H. Liu, and J. S. Chang. 2008a. Improved phototrophic H₂ production with *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates. *Bioresour. Technol.* **99**: 3609-3616.
3. Chen, C. Y., M. H. Yang, K. L. Yeh, C. H. Liu, and J.S. Chang. 2008b. Bio-hydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *Int. J. Hydrogen Energy*. doi:1.1016/j.ijhydene. 2008.06.055.
4. Chen, S. D., D. S. Sheu, W. M. Chen, Y. C. Lo, T. I. Huang, C. Y. Lin. 2007. Dark hydrogen fermentation from hydrolyzed starch treated with recombinant amylase originating from *Caldimonas taiwanensis* On1. *Biotechnol. Prog.* **23**: 1312-1320.
5. Chen, X., Y. Sun and Z. Xiu. 2006. Stoichiometric analysis of biological process for biohydrogen from glucose, *Int. J. Hydrogen Energy* **31**: 539-549.
6. Chin, H. L., Z. S. Chen, and C. P. Chou. 2003. Fedbatch operation using *Clostridium acetobutyricum* suspension cultures as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnol. Prog.* **19**: 383-388.
7. Collet, C., N. Alder, J. P. Schwitzguebel, and P. Peringer. 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int. J. Hydrogen Energy*. **29**: 1479-1485.
8. Das, D. and T. N. Veziroglu. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *Int. J. Hydrogen Energy* **26**: 13-28.
9. Evvyemie, D., K. Morimoto, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2001. Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. *J. Biosci. Bioeng.* **91**: 339-343.
10. Fabiano, B. and P. Perego. 2002. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**: 149-156.
11. Frank, W. L., P. Chain, L. Hauser, J. Lamerdin, S. Malfatti, L. Do, M. L. Land, D. A. Pelletier, J. T. Beatty, A. S. Lang, F. R. Tabita, J. L. Gibson, T. E. Hanson, C. Bobst, J. L. Torres, Y. Torres, C. Peres, F. H. Harrison, J. Gibson, and C. S. Harwood. 2003. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotech.* **22**: 55-61.
12. Herbert, D., P. J. Philipps, and R. E. Strange. 1971. Carbohydrate analysis, *Methods Enzymol* **5B**: 265-277.
13. Ishikawa, M., S. Yamamura, Y. Takamura, K. Sode, E. Tamiya, and M. Tomiyama. 2006. Development of a compact high-density microbial hydrogen reactor for portable bio-fuel cell system, *Int. J. Hydrogen Energy* **31**: 1484-1489.
14. Jo, J. H., D. S. Lee, D. Park, W. S. Choe, and J. M. Park. 2008. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods, *Bioresour. Technol.* **99**: 2061-2066.
15. Kim. K. H., Y. J. Choi, and E. Y. Kim. 2008. The optimization of biohydrogen production medium by dark fermentation with *Enterobacter aerogenes*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 54-58.
16. Korea Ministry of Environment, 2006, Comprehensive plan of the organic wastes of Korea.
17. Kumar, K. and D. Das. 2000. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem.* **35**: 589-593.
18. Kumar, K. and D. Das. 2001. Electron microscopy of hydrogen producing immobilized *E. cloacae* IIT-BT 08 on natural polymers, (2001), *Int. J. of Hydrogen Energy* **26**: 1155-1163.
19. Levin, D. B., R. Islam, N. Cicek, and R. Sparling. 2006. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Process Biochem.* **31**: 1496-1503.
20. Liu, B.-F., N.-Q. Ren, De-F. Xing, J. Ding, G.-X. Zheng, W.-Q. Guo, J.-F. Xu, and G.-J. Xie. 2009. Hydrogen production by immobilized *R. faecalis* RLD-53 using soluble metabolites from ethanol fermentation bacteria *E. harbinense* B49. *Biores. Technol.* **100**: 2719-2723.
21. Lo, Y. C., W. M. Chen, C. H. Hung, S. D. Chen, J. S. Chang. 2008. Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Res.* **42**: 827-842.
22. Morimoto, M. and M. Atsuko. 2004. Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**: 709-713.
23. Momirlan, M. and T. Veziroglu. 1999. Recent directions of world hydrogen production, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **3**: 219-231.
24. Momirlan, M. and T. Veziroglu. 2002. Current status of hydrogen energy, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **6**: 141-179.
25. Ogino, H. T. Miura, K. Ishimi, M. Seki, and H. Yoshida. 2005. Hydrogen production from glucose by anaerobes. *Biotechnol. Prog.* **21**: 1786-1788.
26. Redwood, M. D. and L. E. Macaskie. 2006. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose, *Int. J. Hydrogen Energy* **31**: 1514-1521.
27. Tao, Y., Y. Chen, Y. Wu, Y. He, and Z. Zhou. 2007. High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *Int. J. Hydrogen Energy*. **32**: 200-206.
28. Thompson, J. D., D. G. Higgin. and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
29. Yokoi, H., T. Ohkawara, J. Hirose, S. Hayashi, and Y. Takasaki. 1995. Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J. Ferment.*

- Bioeng.* **80**: 571-574.
30. Yokoi, H. and R. Maki. 2002. Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes, *Biomass and Bioenergy* **22**: 389-395.
31. Yun, Y.-S., S.-K. In, J.-S. Baek, S. H. Park, Y.-K. Oh, and M.-S. Kim. 2005. Two-stage biological hydrogen production by *Rhodopseudomonas palustris* P4. *Trans. of the Kor. Hydro. and New Ener. Soc.* **16**: 315-323.
32. Zhang, H., M. A. Bruns, and B. E. Logan. 2006. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutyricum* in an unsaturated flow reactor. *Water Res.* **42**: 827-842.

(Received April 4, 2009/Accepted May 15, 2009)