

## *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785를 이용한 수소생산 최적화 조건 탐색

<sup>1</sup>김 중 곤 · <sup>1</sup>Le Nhat · <sup>2</sup>김 성 준 · † <sup>3</sup>김 시 옥  
<sup>1</sup>조선대학교 생물신소재학과, <sup>2</sup>전남대학교 환경공학과, <sup>3</sup>조선대학교 환경공학부  
(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

## Optimization of Hydrogen Production using *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785

Jung Kon Kim<sup>1</sup>, Le Nhat<sup>1</sup>, Seong-Jun Kim<sup>2</sup>, and Si Wouk Kim<sup>3†</sup>

<sup>1</sup>Department of Bio Materials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

<sup>2</sup>Department of Civil, Geosystem and Environmental Engineering,  
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>3</sup>Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

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

Optimum culture conditions and medium composition for hydrogen production by *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785 were investigated. Initial pH and temperature for growth were 7.0 and 35°C, respectively. Agitation accelerated the hydrogen production. Although *C. beijerinckii* KCTC 1785 could grow up to 6% (w/v) glucose in the medium, the optimum glucose concentration for hydrogen production was 4% and hydrogen content in the biogas was 37% (v/v). However, the economical glucose concentration for hydrogen production was 1% regarding to the residual glucose which was not used in the medium. During hydrogen fermentation, acetic and butyric acid were produced simultaneously. High concentrations of acetic (>5,000 mg/L) or butyric (>3,000 mg/L) acid inhibited hydrogen production. When pH was maintained at 5.5 in the batch fermentation, 1,728 mL of hydrogen was produced from 0.5% glucose within 15 hr. H<sub>2</sub> yield was estimated to be 1.23 mol H<sub>2</sub>/mol glucose. It was found that yeast extract or tryptose in the medium was essential for hydrogen production.

**Key Words** : Biohydrogen, dark fermentation, organic acid, *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785

### 서 론

인류의 산업발달과 성장을 위한 에너지소비는 심각한 에너지 문제에 직면할 위기에 처해 있고, 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 재생가능하고 환경친화적인 대체 에너지 개발에 많은 관심을 기울이고 있다. 특히 수소에너지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며(1-3), 현재 알려진 수소의 생산방법으로는 화석연료, 물, 바이오매스로부터 열화학적, 전기화학적, 광화학적 혹은 생물학적 방법이 있다. 화석연료를 이용한 열화학적 방법에 의한 수소생산은 공정의 안전성과 경제성에 대한 문제 및 화석연료의

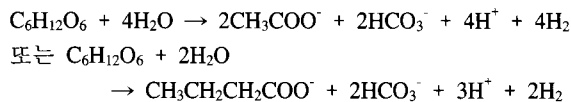
부존성과 편재성에 의한 국가간 긴장과 지구환경 오염 등의 문제점을 가지고 있다. 그러나 생물학적 수소생산의 경우 열화학적 방법에 비해 수소 생산수율은 떨어지지만, 보다 더 안전하며 바이오매스를 포함한 유기물과 물로부터 미생물에 의해 직접적으로 수소를 생산할 수 있기 때문에 에너지 생산과 더불어 대량으로 발생하는 재생가능 폐기물도 처리할 수 있는 특징을 가지고 있다. 따라서 수소생산을 위한 궁극적인 향후 수소 생산기술은 태양광, 수력, 풍력, 미생물과 같은 청정 기술을 이용하여, 지구상에 풍부하게 존재하는 물로부터 수소를 생산하고 이용 후에 다시 물로 재순환하는 방법이거나, 계속해서 증가하는 재생가능 폐기물을 원료로 수소를 생산하여야 할 것으로 전망하고 있다.

미생물을 이용한 생물학적 수소 생산 방법은 크게 빛을 이용하는 광발효와 빛을 이용하지 않는 암발효로 구분되며, 전자의 경우 조류(4, 5) 및 Cyanobacteria(6-8)를 이용한

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel : +82-62-230-6649, Fax : +82-62-225-6040  
E-mail : swkim@chosun.ac.kr

물의 광분해와 광합성 세균(9-11)을 이용한 유기물의 광분해 방법이 해당되고 후자의 경우 혐기성 발효미생물을 이용(12-16)하여 유기물로부터 수소를 생산하는 방법이다. 광발효의 경우 빛이 필요하므로 배양장치가 대형화 되는 문제가 있지만 암발효의 경우 광발효보다 시설이 소규모이고 기술적 제한이 적어 수소생산이 용이하며 다양한 유기성물질을 기질로 사용할 수 있고, 기존의 혐기성 공정을 재이용하여 생산할 수 있다는 장점이 있다.

암발효를 통한 혐기성 소화 공정에서 유기물질은 고분자물질에서 저분자물질로 분해되는 가수분해단계와 가수분해된 물질로부터 유기산, 이산화탄소, 수소를 생성하는 산생성단계, 그리고 산생성단계의 산물로부터 메탄생성 단계를 거치면서 최종적으로 메탄과 이산화탄소로 전환된다. 따라서 혐기성소화공정 가운데 수소를 소모하는 메탄생성균의 활성을 억제할 경우 발효조 내의 수소생산량이 증가할 수 있다. 1980년대 이후로 혐기성 미생물을 이용한 수소생산에 대한 연구가 이루어지고 있으며 특히 *Clostridium* sp.는 glucose나 sucrose와 같은 탄수화물로부터 유기산과 수소를 생산하는데 많이 이용되어져 왔다(17). *Clostridium* sp.에 의해 glucose로부터 수소가 생산되는 과정은 아래의 반응들에 의해 일어난다(18, 19).



Acetic acid가 생산되는 경우 1 mole의 glucose로부터 최대 4 mole의 수소가 생산될 수 있으며, butyric acid가 생산되는 경우에는 최대 2 mole의 수소가 생산될 수 있다. 그러므로 암발효 과정 중 발생하는 유기산의 생산조건을 조절함으로써 수소생산량을 증가시킬 수 있다. 본 연구에서는 *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785를 이용하여 회분식으로 수소를 생산하기 위한 발효 최적화 조건을 탐색하고 동시에 배지조성을 최적화하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 한국생명공학연구원의 유전자은행 (Korean Collection for Type Culture)에서 분양받은 *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785를 사용하였다. 세균의 배양 및 수소생산실험을 위한 배지로 Table 1에 나타난 Reinforced clostridial medium (RCM)을 이용하였으며, 배지성분을 최적화하기위한 최소배지는 Table 2에 나타난 Standard mineral base medium (SMM)을 사용하였다.

### 배양조건

균주의 전배양은 100 mL media bottle에 50 mL의 배지를 넣고 멸균한 후 vacuum anaerobic chamber 내에서 균주를 접종한 다음 35°C, 150rpm으로 진탕배양 하였으며, 실험에 사용하기 전에 12시간마다 계대배양 하였고 전배양을 최소 3

차례이상 수행하였다. 수소생산을 위한 본 배양은 가스측정 및 시료채취를 위해 상부에 가지가 달린 500 mL media bottle을 만들어 200 mL의 배지를 넣고 전배양에서 성장시킨 균주를 1% (v/v) 접종하여 전배양과 같은 조건으로 회분식 배양하였다. 또한 수소생산 실험 중 배지의 pH를 일정하게 유지시키는 실험에서는 5 L 발효조 (KoBioTech, KF-5L)에 2 L의 배지를 넣고 위와 동일한 방법으로 배양하였다.

Table 1. Composition of Reinforced Clostridial Medium

Components	Amounts
Tryptose	10.0 g
Beef extract	10.0 g
Yeast extract	3.0 g
Dextrose	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Soluble starch	1.0 g
Cysteine hydrochloride	0.5 g
Sodium acetate	3.0 g
D.W	1.0 L

Table 2. Composition of standard mineral base medium

Components	Amounts
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.34 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g
Ferric EDTA solution <sup>a</sup>	0.1 mL
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 mg
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.5 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.1 mg
Cobalt nitrate	0.1 mg
Sodium Borate	0.1 mg
Sodium molybdate	2.0 mg
D.W	1.0 L

<sup>a</sup> The ferric EDTA solution was made by combining a solution containing 17.9 g of sodium EDTA and 3.23 g of KOH dissolved in 186 mL distilled water and a solution containing 13.7 g of FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O in 364 mL of distilled water. The mixture was bubbled overnight with air, and stored in a brown glass bottle.

### 수소생산 최적화 조건탐색

수소생산을 최적화하기 위해 배양배지의 초기 pH, 교반유무, 온도, 유기산이나 glucose 농도 및 회분식 실험기간 중 발효조 내의 pH 유지에 따른 수소생산의 영향을 검토하였다.

### 배지성분 최적화

수소생산을 위한 배지성분을 최적화하기위해 최소배지인 SMM에 RCM의 각각의 구성성분을 조합한 배지를 제조하여 균주를 배양하였다. 계대배양을 수차례 반복하여 균주의 성장 정도를 확인함으로써 배지의 각 성분을 최적화 하였다.

### 분석방법

발효과정 중 발생하는 바이오가스의 양은 가스미터를 이용하여 측정하였으며, pH는 pH meter (Orion, 720A)를 사용하였고, 발효액 내의 당농도는 DNS 법(20)에 의해 측정하였다.

수소의 함량분석은 반응기내 head space 가스를 gas tight syringe로 0.5 mL 취하여 gas chromatography (Shimazu, GC-17A)로 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 Molecular sieve 5A (Alltech)를 사용하였고, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 분석조건은 column, injector, detector 온도 모두 60°C이었으며, carrier gas는 Ar을 사용하였고, flow rate는 45 mL/min으로 유지하였다.

발효액 내의 유기산의 함량분석은 발효액을 일정시간 간격으로 채취하여 균체와 상등액을 원심분리기로 분리한 후 상등액 100 µL를 취하여 gas chromatography (Younglin, M600D)로 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax (Supelco)를 사용하였고, flame ionization detector (FID)로 분석하였다. 분석조건 중 column 온도는 최초 135°C에서 2분간 유지한 후 165°C까지 분당 15°C씩 승온하여 1.7분간 유지한 다음 다시 180°C까지 분당 15°C씩 승온한 뒤 20분간 유지하였고, 이후 또 다시 200°C까지 분당 15°C씩 승온하여 15분간 유지하였다. 또한 injector와 detector의 온도는 모두 200°C이었으며, carrier gas는 N<sub>2</sub>를 사용하였고, flow rate는 24 mL/min으로 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**수소생산에 대한 초기 pH의 영향**

초기 pH에 따른 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 성장정도 및 수소생산에 대한 영향을 알아보기 위해 배양배지의 초기 pH를 6-8로 조절하였다. 그 결과 Fig. 1A에 의하면 초기 pH를 6으로 조절한 경우 18시간 후 가장 높은 흡광도를 나타냈으며 다음으로 7과 8로 초기 pH를 조절한 순으로 나타났다. 그러나 생산속도에 있어서는 초기 pH를 7로 조절하였을 때 가장 빨랐다. 게다가 초기 pH가 증가할수록 균주가 성장하는데 있어서 보다 긴 lag phase를 요구하였다. 이는 접종균으로 사용된 전 배양액의 pH가 초기 배지의 pH보다 낮아 균체가 이에 적응하는데 요구되는 시간으로 생각된다. 또한 Fig. 1B에 나타난 바와 같이 24시간 후 생산된 수소의 양은 초기 pH가 6인 경우와 7인 경우 모두 각각 89 mL와 88 mL로 비슷하였지만 발효 초기 수소생산 속도를 고려한다면 초기 pH를 7로 조절한 경우가 가장 수소생산에 효율적인 것으로 사료된다. 또한 초기 pH를 7로 조절하였을 경우 생산된 바이오가스 가운데 수소의 최고 함량은 26.8%이었다. Lee 등(21)의 결과에 의하면 초기 pH가 갑자기 떨어지면서 수소가 생산된다고 보고하였다. 또한 Khanal 등(22)은 초기 pH는 수소생산에 있어서 중요한 인자로 작용하며, 갑작스런 pH의 감소에 의한 환경조건의 변화가 세균의 물질대사의 변화를 가져오고 그로인해 수소생산의 저해를 초래한다고 보고하였다. 따라서 초기 pH가 높을수록 빠른 pH 변화에 대한 충격의 영향을 덜 받기 때문에 수소생산에 있어서 효율적이라고 생각된다. 하지만 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 경우 초기 pH 8 이상에서는 균체의 성장 및 수소생산이 현저히 저하하므로 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 최적 초기 pH는 7로 판단된다. 그리고 초기 pH는 발효되는 가운데 유기산의 생성

에도 영향을 주었으며 pH가 증가할수록 acetic acid의 생산량이 많았고, butyric acid의 양은 상대적으로 감소하였다 (Fig. 1C).

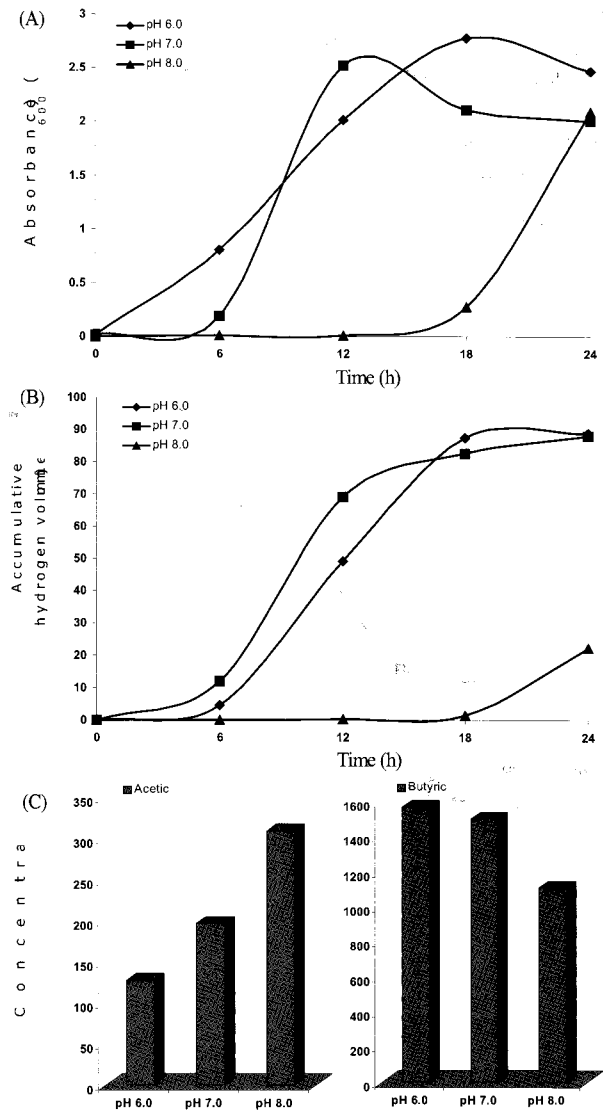


Figure 1. Effect of initial pH on (A) cell growth (B) hydrogen production and (C) organic acids production.

**교반유무에 따른 수소생산의 영향**

Fig. 2에서는 교반의 유무가 발효에 미치는 영향을 나타내었다. 균주 배양시 교반을 해주었을 경우 균체의 성장속도가 빨라졌음을 알 수 있으며, 수소생산에 있어서는 15시간 동안 발효하는 과정 중 교반한 경우 158 mL의 수소를 발생한 반면, 교반하지 않은 경우 83 mL의 수소를 발생하여 약 2배의 수소 발생량 차이를 보여주었다. 그러므로 수소생산에 있어서 교반은 반드시 필요한 조건으로 판단된다.

**수소생산에 대한 발효온도의 영향**

Fig. 3에서는 발효온도에 따른 균체의 성장정도 및 수소생산에 대한 결과를 나타내었다. 발효온도를 각각 25~45°C까지 5°C 간격으로 조절하여 실험을 수행하였으며, 40°C의

발효온도까지는 수소를 발생하였지만 그 이상의 온도에서는 고온으로 인한 열충격으로 균체가 성장하지 못하여 수소를 생산할 수 없었다. 발효온도를 35°C로 조절하였을 때 균체의 성장이 가장 빨랐으며, 또한 생산된 수소의 양은 145 mL로 가장 많은 양의 수소를 생산하였다. 수소생산과 밀접한 관련이 있는 유기산의 생산에 있어서도 30°C의 발효온도의 경우 acetic acid의 생산량이 35°C의 경우보다 높았지만 butyric acid의 생산량에 있어서 30°C와 35°C사이에 현저한 차이를 보임을 알 수 있었다. 따라서 35°C의 발효 온도에서 수소생산량이 최대로 나타난 것으로 보아 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 최적배양온도는 35°C로 사료된다. 이것은 Taguchi 등(15, 23)이 *C. beijerinckii* AM21을 이용한 결과와 일치하였다.

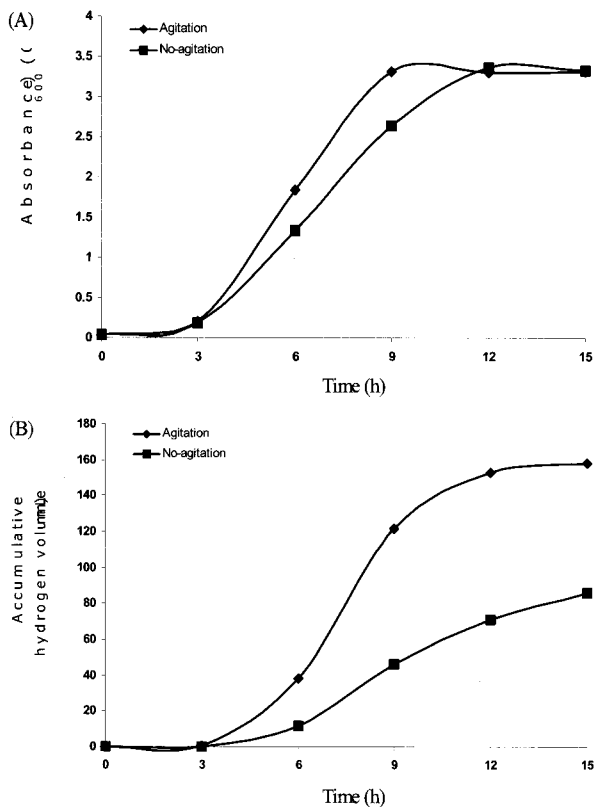


Figure 2. Effect of agitation on (A) cell growth and (B) hydrogen production.

수소생산에 대한 glucose 농도의 영향

Glucose 농도에 대한 영향을 조사하기 위하여 배지내의 glucose 농도를 1-7%로 조절하여 실험한 결과 *C. beijerinckii* KCTC 1785는 배지내의 glucose 농도가 6%까지 생장이 가능하였으며, 7% 이상에서 현저히 성장에 저해를 받았다 (Fig. 4A). 또한 발효기간 중 4%의 초기 당농도에서 가장 많은 수소를 생산하였지만(Fig. 4B), 2% 이상의 glucose 농도에서는 발효가 끝난 후에도 많은 양의 glucose가 발효액 내에 남아있는 것을 알 수 있었다(Fig. 4C). 따라서 남아있는 glucose 농도를 고려해 볼 때 1%의 초기 glucose 농도가 최적인 것으로 사료된다. 그러나 이 현상은 발효가 시작되면서 발생된 유기산의 축적과 이것으로 인한 pH 감소에 의

해 더 이상 수소가 생산되지 않은 것으로 생각되며, 따라서 발효액 내에서 pH가 급속히 떨어지는 것을 제어하여 계속적으로 일정하게 pH를 유지하도록 조절한다면 보다 많은 양의 수소를 생산할 수 있을 것으로 사료되었다.

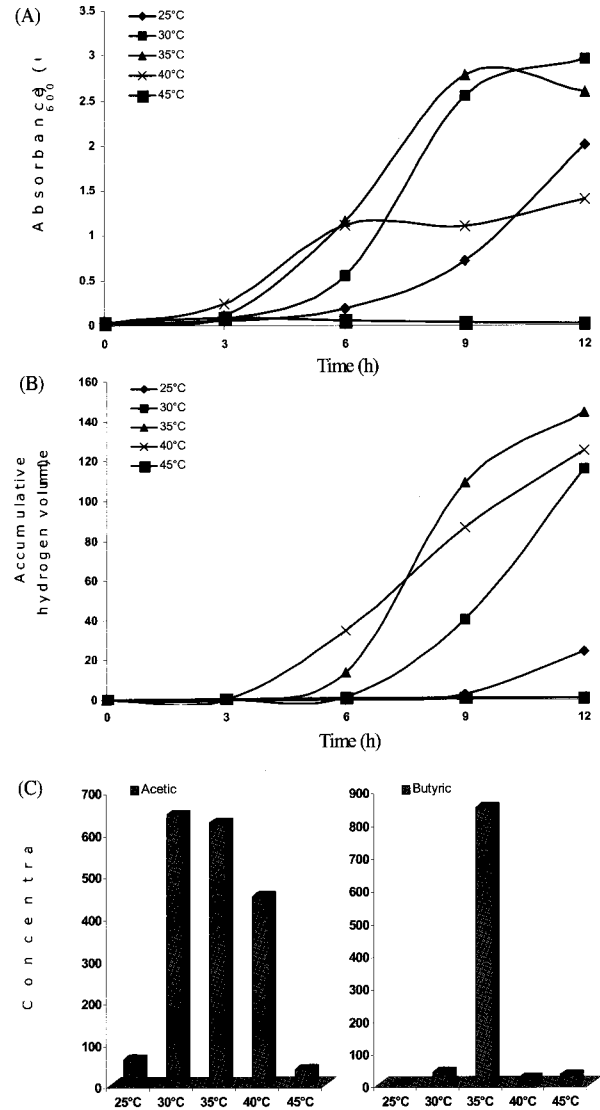


Figure 3. Effect of temperature on (A) cell growth (B) hydrogen production and (C) organic acids production.

수소생산에 대한 유기산 농도의 영향

*C. beijerinckii* KCTC 1785를 이용하여 유기물을 발효할 경우 발효하는 동안 수소와 동시에 acetic acid, butyric acid와 같은 유기산도 생성된다. 생성된 유기산으로 인해 pH의 저하가 나타나고 최종적으로 pH가 5.0 미만으로 떨어지면 더 이상 수소가 생산되지 않는 것으로 판단된다. 이것은 앞선 실험의 결과들에서 발효가 끝난 후 발효액의 최종 pH를 측정할 결과 4.6 이하인 점을 고려할 때 이와 같이 생각할 수 있다. 또한 발생하는 유기산 자체가 독성이 있으므로 미생물에 해를 미칠 수 있다. Van Niel 등(24)은 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*에 의한 수소생산시 최종 산물에 의한 저해로써 acetic acid의 저해영향을 보고한 바

있으며, 따라서 발생하는 유기산의 농도 또한 수소생산의 중요한 인자이다. Fig. 5A와 B는 배지 내에 acetic acid와 butyric acid를 각각 농도별로 첨가하였을 경우 수소생산에 미치는 결과를 나타낸 것이다. 배지 내의 acetic acid의 농도가 4,000 mg/L의 농도까지는 수소생산에 아무런 영향을 받지 않았으며 오히려 4,000 mg/L의 경우 수소생산량이 약간 증가하는 것이 관찰되었다. 하지만 5,000 mg/L의 acetic acid의 농도에서는 수소생산이 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었다. 반면 butyric acid의 경우 acetic acid에 비해 낮은 농도인 2,000 mg/L의 농도까지는 수소생산에 그다지 영향을 미치지 않았지만 3,000 mg/L 이상의 농도에서는 수소생산에 저해를 받는 것을 알 수 있었다. 따라서 지속적인 수소생산을 위해서는 반응기 내에 축적되는 유기산을 제거해줌으로써 수소생산을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

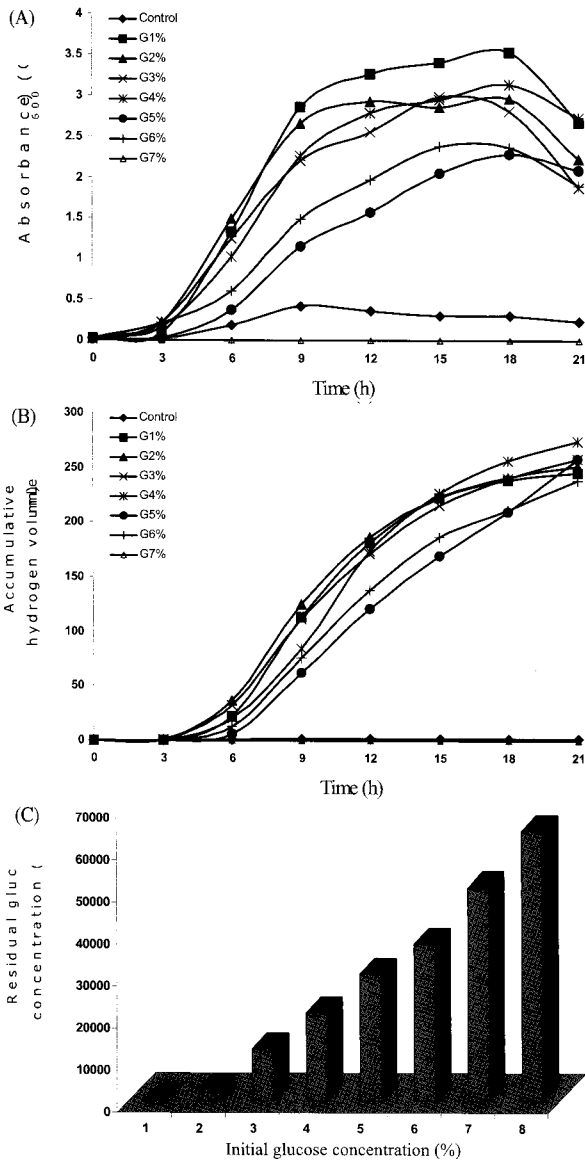


Figure 4. Effect of glucose concentration on (A) cell growth (B) hydrogen production, and residual glucose concentration after fermentation (C).

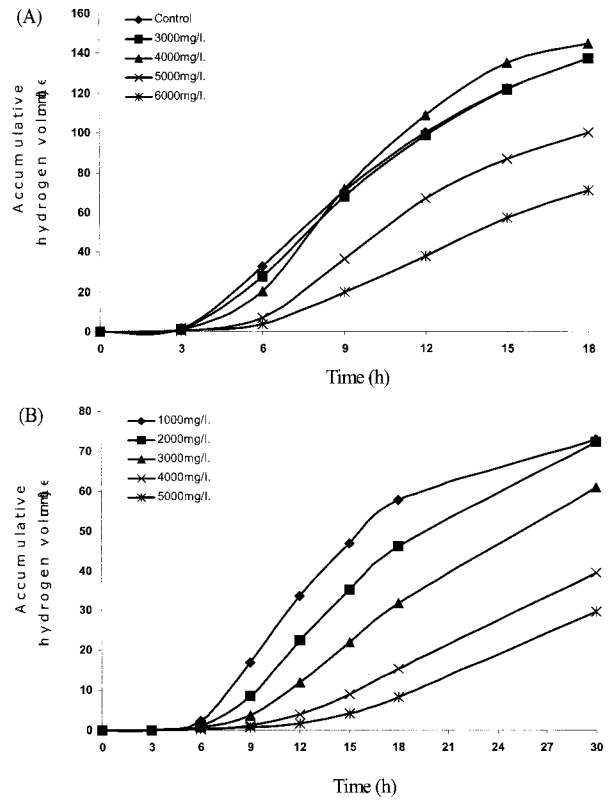


Figure 5. Effect of high concentration of (A) acetic and (B) butyric acid on hydrogen production.

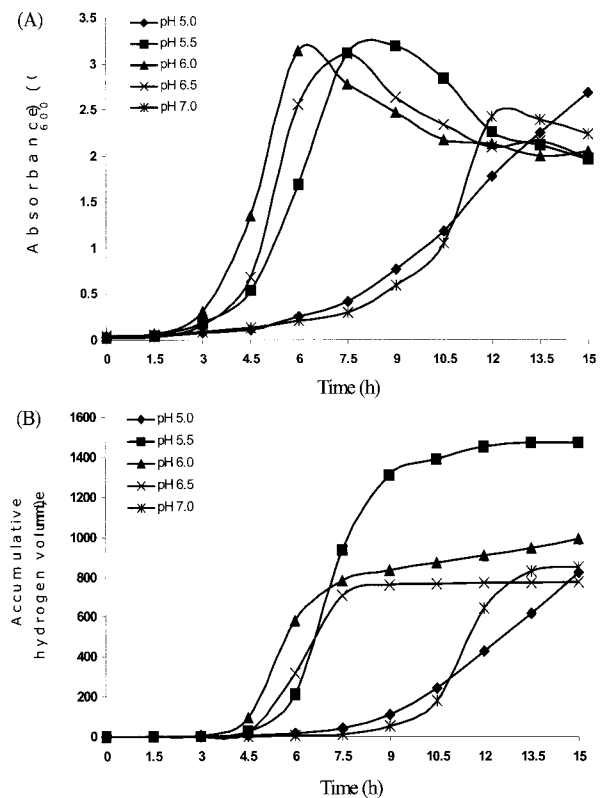


Figure 6. Effect of pH control on (A) cell growth and (B) hydrogen production during fermentation.

### 발효액 최적 pH 탐색

발효액의 최적 pH를 조사하기 위해 발효가 진행되는 동안 HCl과 KOH 용액을 이용하여 발효조 내의 pH를 일정하게 유지하였다. pH조절은 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 그리고 7.0으로 유지하였으며 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 균체의 생장은 발효액의 pH가 6.0일 때 가장 빨리 성장하였으며, 다음으로 pH가 6.5, 5.5, 7.0 및 5.0의 순으로 조사되었다(Fig. 6A). 하지만 수소생산에 있어서는 발효액의 pH가 5.5로 유지되었을 때 15시간동안 0.5%의 glucose로부터 1,728 mL의 수소를 생산하여 다른 조건에 비해 월등히 많은 양의 수소를 생산하였고, 이 때 생성된 바이오가스 중 수소의 함량 및 생산 수율은 각각 32%와 1.23 mol H<sub>2</sub>/mol glucose이었다(Fig. 6B). 일반적으로 수소와 유기산을 생성하는데 필요한 적정 pH는 4.8- 6.8이라고 Van Andel 등(25)은 보고하고 있으며, 본 실험의 결과 또한 유사하게 나타나 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 생장은 pH를 6.0으로 유지하였을 경우 최대이고, 수소생산 최적 pH는 5.5로 유지하였을 때 최적임을 알 수 있었다. 따라서 *C. beijerinckii* KCTC 1785를 이용해 회분식 발효로 수소생산을 할 경우 초기 pH를 7로 한 후 서서히 발효조의 pH를 5.5로 유지하고, 교반을 시키며, 35°C에서 1-2%의 glucose 농도를 가지고 발효할 경우 수소생산을 최적화할 수 있을 것으로 사료된다.

**Table 3.** Determination of cell growth on different medium composition

Medium composition	Growth
SMM <sup>a</sup> + Glucose	-
SMM <sup>a</sup> + Soluble starch	-
SMM <sup>a</sup> + Glucose + Yeast extract	++
SMM <sup>a</sup> + Glucose + Beef extract	-
SMM <sup>a</sup> + Glucose + Tryptose	++
SMM <sup>a</sup> + Glucose + Cysteine HCl	-
RCM <sup>b</sup>	++

<sup>a</sup>SMM: Standard Mineral Medium

<sup>b</sup>RCM: Reinforced Clostridial Medium

### 배지성분의 최적화

수소생산 배지성분의 최적화를 위해 최소배지 SMM에 *C. beijerinckii* KCTC1785의 배양배지인 RCM의 각 구성성분을 하나씩 첨가하여 균주를 배양하였다. 그 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 배지성분 내에 yeast extract나 tryptose가 결여된 배지 내에서는 균주가 성장할 수 없는 것을 알 수 있었다. 따라서 *C. beijerinckii* KCTC 1785를 이용하여 수소를 생산할 경우 발효배지 내에 반드시 탄소원과 함께 yeast extract나 tryptose 성분이 포함되어야 할 것으로 판단된다. 또한 RCM에서 cystein hydrochloride를 결여시켰을 경우 균주의 성장이 대조군에 비해 떨어졌지만(data not shown), SMM과 탄소원인 glucose 및 cystein HCl만을 조합하여 제조한 배지에서 배양한 결과 균주가 성장하지 않았다. 따라서 cystein HCl의 경우 균주의 성장에 반드시 필요한 성분은 아니지만 *Cl. beijerinckii* KCTC 1785의 성장에 필요한 성장 촉진인자로 작용하는 것으로 사료된다.

### 요 약

본 연구는 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 배양배지 (RCM)에서 수소생산을 위한 최적화 조건을 탐색하고 수소생산을 위한 배지성분을 최적화하였다. 수소생산을 위한 최적 초기 pH와 발효온도는 각각 7.0과 35°C이었고, 교반은 수소생산을 가속화 시켰다. *C. beijerinckii* KCTC 1785는 6% (w/v)의 glucose 농도까지 성장할 수 있지만 4%의 glucose 농도에서 가장 많은 수소를 생산하였으며, 이 때 바이오가스 중 수소 함량은 37% (v/v)이었다. 그러나 배지내 잔여 glucose 양을 고려할 때 수소생산을 위한 최적 glucose 농도는 1%이었다. 발효가 진행되는 동안 수소가 생산됨과 동시에 acetic acid와 butyric acid가 동시에 생성되었으며, acetic acid와 butyric acid가 각각 5,000 mg/L과 3,000 mg/L 이상의 농도에서 수소생산을 저해하였다. 또한 발효조의 pH를 5.5로 계속 유지하였을 경우 15시간 동안 0.5% glucose로부터 1,728 mL의 수소를 생산하였으며 이 때 수소의 생산수율은 1.23 mol H<sub>2</sub>/mol glucose이었다. *C. beijerinckii* KCTC 1785의 성장에 있어서 yeast extract 또는 tryptose는 반드시 필요한 배지의 성분이었다.

### 감 사

본 연구는 2005년도 조선대학교 교내학술 연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Oh, Y. K., M. S. Park, E. H. Seol, and S. Park (2003), Isolation of hydrogen-producing bacteria from granular sludge of upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Biotech. Bioprocess Eng.* **8**, 54-57.
- Oh, Y. K., Y. J. Kim, J. Y. Park, T. H. Lee, M. S. Kim, and S. Park (2005), Biohydrogen production from carbon monoxide and water by *Rhodospseudomonas palustris* P4, *Biotech. Bioprocess Eng.* **10**, 270-274.
- Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung (2004), Culture conditions for hydrogen production of *Enterobacter cloacae* YJ-1, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 446-450.
- Schnackenberg, J., R. Schulz, and H. Senger (1993), Characterization and purification of a hydrogenase from eukaryotic green alga *Scenedesmus obliquus*, *FFB Lett.* **327**, 21-24.
- Greenbaum, E. (1990), Hydrogen production by photosynthetic water splitting. In *Hydrogen energy progress VIII*, T.N. Veziroglu, P. K. Takashashi Eds.; Proceedings 8th WHEC, Hawaii. New York: Pergamon Press, pp743-754.
- Banerjee, M., A. Kumar, and H. D. Kumar (1989), Factors regulating nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Azolla-Anabaena* symbiosis, *J. Hydrogen Energy.* **12**, 871-879.
- Shi, D. J., M. Brouers, D. O. Hall, and R. J. Rubin (1987), The effects of immobilization on the biochemical, physiological and morphological features of *Anabaena azollae*, *Planta* **172**, 298-308.
- Tsygankov, A.S., L. T. Serebryakova, D. A. Sueshnikov, K. K. Rao, I. N. Gogotov, and D. O. Hall (1997), Hydrogen photo-production by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and dependence on pH, *J. Hydrogen Energy* **22**, 859-867.

9. Fascetti, E., E. D'addario, O. Todini, and A. Robertiello (1998), Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes, *J. Hydrogen Energy* **23**, 753-760.
10. Krahn, E., K. Schnerder, and K. Muller (1996), Comparative characterization of H<sub>2</sub> production by the conventional Mo nitrogenase and alternative "iron-only" nitrogenase of *Rhodobacter capsulata* hap mutants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 285-290.
11. Singh, S. P. and S. C. Srivastava (1991) Isolation of non-sulfur photo-synthetic bacteria strains efficient in hydrogen production at elevated temperatures, *J. Hydrogen Energy* **16**, 404-405.
12. Tanisho, S., N. Wakao, and Y. Kokako (1983), Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*, *J. Chem. Eng. Jpn.* **16**, 529-530.
13. Kumar, N. and D. Das (1999), Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *Process Biochem.* **35**, 589-594.
14. Tanisho, S., Y. Suzuki, N. Wakoo (1987), Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005, *J. Hydrogen Energy* **12**, 623-627.
15. Taguchi, F., J. D. Hang, S. Taguchi, and M. Morimoto (1992), Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 244-245.
16. Collet, C., N. Adler, J. P. Schwitzguebe, and P. Peringer (2004), Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1479-1485.
17. Lay, J. J., K. S. Fan, J. Chang, and C. H. Ku (2003), Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge, *Int. J. Hydrogen Energy* **28**, 1361-1367.
18. De Vrije, T. and P. A. M. Claassen (2003), Bio-methane & Biohydrogen; Dark hydrogen fermentation, *Dutch Biological Hydrogen Foundation*, 104-105.
19. Han, S. K. and H. S. Shin. (2004), Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 569-577.
20. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
21. Lee, Y. J., T. Miyahara and T. Noike (2002), Effect of pH on microbial hydrogen fermentation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, 694-698.
22. Khanal, S. K., W. H. Chen, L. Li, and S. Sung (2004), Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1123-1131.
23. Taguchi, F., N. Mizukami, K. Hasegawa, T. Saito-Taki, and M. Morimoto (1994), Effect of amylase accumulation on hydrogen production by *Clostridium beijerinckii*, strain AM21B, *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 565-567.
24. J. van Niel, E. W., P. A. M. Claassen, A. J. M. Stams (2003), Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 255-262.
25. Van andel, J. G., G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, and A. M. Breure (1985), Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture, *Appl. Micro. Biotechnol.* **23**, 21-26.