

Chlamydomonas reinhardtii 연속 배양에서 수소생산을 위한 황 조절

¹김 준 표 · ²박 태 현 · ³김 미 선 · † ¹심 상 준

¹성균관대학교 공과대학 화학공학과, ²서울대학교 화학생물공학부, ³한국에너지기술연구원 바이오매스팀

(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

Sulfate Modulation for Hydrogen Production by *Chlamydomonas reinhardtii* in Continuous Culture

Jun Pyo Kim¹, Tai Hyun Park², Mi Sun Kim³, and Sang Jun Sim^{1†}

¹Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, Changan-gu, Suwon 440-746, Korea

²School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Gwanak-gu, Seoul 151-744, Korea

³Biomass Research Team, Korea Institute of Energy Research, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

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

We investigated the effect of sulfate re-addition on hydrogen production under sulfur-deprived condition. When the final concentration of sulfate to cell suspensions (0~120 μM) was increased, chlorophyll concentration, culture density, and total amount of H_2 produced, increased up to an optimal concentration of 30 μM MgSO_4 . Maximum hydrogen volume was 236 mL H_2/L culture at 30 μM MgSO_4 . However, the addition of excess sulfate (above MgSO_4 60 μM) delayed the start of hydrogen production and the induction of hydrogenase. Accordingly, the final yield of hydrogen production was reduced. Using these results, we attempted the continuous and sustained hydrogen production by sulfate re-addition (30 μM MgSO_4) using a single *C. reinhardtii* culture for up to 4 cycles. In total, hydrogen production volume was 625 mL H_2/L culture.

Key Words : Continuous hydrogen production, *Chlamydomonas reinhardtii*, sulfur deprivation, photosynthesis, sulfate modulation

서 론

현재 우리가 이용하고 있는 에너지는 거의 대부분이 화석연료 (석유, 석탄, 천연가스 등)에 의해 공급되고 있다. 이러한 화석에너지는 매장량이 한정되어 있기 때문에 궁극적인 고갈에 대비해 새로운 연료원의 개발이 반드시 이루어져야만 한다. 또한 화석연료의 과도한 이용으로 이산화탄소가 발생되어 지구의 온난화가 심각해지고 있다. 이 같은 문제를 해결하기 위해 수력, 풍력, 지열의 이용, 석탄자원의 재이용, 핵연료 등, 여러 분야에서 다각적인 접근이 시도되고 있으나 지역적 제한성, 환경오염 혹은 부존량의 한계로 인해 크게 효용가치를 인정받지 못하고 있는 실정이다. 따라서 궁극적으로는 장기적인 관점에서의 수소 생산 및 이용이 전 세계적으로 주목받고 있는 실정이다(1, 2).

수소는 지금까지 알려진 연료 중 가장 높은 에너지를

가지고 있으며, 탄소가 함유되어 있지 않아 연소 시 부산물로 물만 발생하여, 지구 온난화와 환경오염을 일으키지 않기 때문에 세계에서 가장 주목하는 대체 에너지이다. 현재 수소의 주요 생산 방법은 hydrocarbon의 스팀 개질을 통해 이루어지고 있지만, 이 방법은 공정상 가격이 비싸고, 생산보다 투입에 더 많은 에너지가 소요된다. 또한 이산화탄소를 배출하기 때문에 궁극적인 수소 생산범으로는 비효율적이다. 이러한 비효율성과 환경오염 문제를 해결하기 위해, 최근에는 물과 빛만 존재하면 세포대사를 통해 수소를 생산할 수 있는 녹조류를 통한 광생물학적 수소생산에 관한 연구가 주목 받고 있다.

녹조류는 식물처럼 광합성 기구를 통해 대기 중 이산화탄소를 고정화하고, 태양에너지를 통해 물을 분해하여 수소와 산소를 만들기 때문에 이산화탄소 제거 및 에너지 생산 측면에서 다른 혐기 미생물보다 더 유용하게 이용될 수 있다(3). 녹조류를 이용한 수소생산에 관한 연구는 1942년 Gaffron과 Rubin에 의해 최초로 보고되었다. 이들은 녹조류의 일종인 *Scenedesmus obliquus*를 이용하여 빛이 있을 때와 없을 때 모두 수소를 생산할 수 있다는 것을 밝혀냈다(4). 녹조류를 통한 수소발생은 세포 내의 reversible hydrogenase의 유도를 위해 얼마간의 혐기배양이 요구된다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Changan-gu, Suwon 440-746, Korea

Tel : +82-31-290-7341, Fax : +82-31-290-7272

E-mail : simsj@skku.edu

그후 hydrogenase는 환원된 ferredoxin으로부터 전자를 공급받아 proton에 전달하여 수소를 합성하여 세포 밖으로 방출하게 된다. 그러나 reversible hydrogenase는 광합성에 의해 발생하는 산소에 의해 그 활성이 감소하거나 완전히 저해를 받는다. 이러한 문제는 녹조류 배양시 배지내의 황(S) 성분의 결핍을 통해 산소 및 수소발생을 시간적, 공간적으로 분리함으로써 해결할 수 있다(5).

조류세포는 황이 배지 내에서 결핍되었을 때, 분열을 멈추고(6), 형태가 타원형에서 원형으로 바뀌며(7), 단백질이나 녹말 등 내부기질을 분해(8)하게 된다. 이러한 반응들 중 가장 주목해야 할 점은 황결핍시 PSII가 파괴되어 물분해에 의한 산소발생이 정지한다는 점이다. 이러한 현상의 원인은 cystein, methionin의 필수성분인 황의 결핍이 단백질의 생합성을 방해하고, PSII 복구 회로를 방해하기 때문이다. 따라서 황결핍 배양 후 물분해에 의한 산소 발생량이 급격히 감소하여, 호흡에 의한 산소 소모량보다 낮아지게 되어 배양액은 신속하게 혐기상태가 된다. 이렇게 혐기상태로의 빠른 전환은 reversible hydrogenase를 신속히 유도하게 되어 광포화 상태에서도 H₂ 생산이 가능해진다. 따라서 1단계에서는 CO₂의 고정화를 통한 세포성장을, 2단계에서는 황결핍에 의한 혐기조건에서 수소를 생산하는 2단 배양공정을 통해 녹조류를 이용한 생물학적 수소생산을 가능하게 한다(5). 위와 같은 개념을 바탕으로 하여 PSII의 잔여 활성(9, 10), 황성분의 잔여 농도(7), 초기 세포밀도, 초기 pH 변화(11, 12), 세포 나이(13), 빛 주기 및 세기(14, 15) 등 황결핍에 의한 생물학적 수소생산에 있어 중요한 인자들이 연구되어져 왔다.

본 연구에서는 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX90을 이용하여 황결핍을 이용한 수소 생산시 가장 중요한 황 농도 최적화를 통해 수소 생산능을 최대화하고자 하였고, 또한 황 재첨가에 의한 연속적인 수소생산을 수행하여 수소생산량의 최대화를 기하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법

본 실험에서 사용한 균주는 *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX90으로 녹조류에 속한다. 이 균주는 UTEX (The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin)에서 구입하였고, 배지는 TAP (Tris-Acetate-Phosphate) 배지 (pH 7.2)를 사용하였다. 본 실험에서 균주 배양은 250 mL Erlenmeyer flask에 배지 120 mL를 working volume으로 하여 수행되었고, 배양 온도는 23°C, 160 rpm인 광배양기에서 배양되었다(16). 이 때, 빛은 형광등으로 약 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 의 세기로 12시간을 주기로 하여 공급되었다.

황결핍 조건

C. reinhardtii 균주는 지수 성장 (약 $4-10 \times 10^6$ cells/mL) 형태로 자란다. 세포가 late exponential phase에 도달하면 TAP 배지 내에서 황성분을 모두 Cl로 치환시킨 TAP minus S 배지를 사용하여 원심분리기에서 2000 xg, 5분 동

안 세포를 7차례 씻어낸 후, 100 mL serum bottle에 세척된 세포를 40 mL 채우고, 배지내 잔여 황성분에 따른 수소생산 효과와 황성분 재첨가에 의한 연속적인 수소생산 공정 최적화를 위해 MgSO₄ 용액을 0, 15, 30, 60, 120 μM 을 재첨가하였다. 그리고 나서, 혐기조건을 만들기 위해 serum bottle을 밀폐하고, 아르곤 가스로 bottle 내부를 치환한 후 23°C, 160 rpm으로 140시간 동안 배양하였다. 이 때 빛은 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 의 세기로 공급하였다. 또한 연속적인 수소생산을 위하여 140시간마다 MgSO₄ 용액 30 μM 을 serum bottle 내에 첨가한 후, 앞에서 언급한 방법과 동일하게 아르곤 가스를 이용하여 serum bottle 내부를 치환하여 주었다. 이러한 방법으로 4회 연속수소생산을 반복하였다.

분석 방법

C. reinhardtii 밀도는 Haemocytometer (Neubauer-ultraplane, Marienfeld, Germany)와 microscope (Y-IDP, Nikon, Japan)를 사용하여 세포 밀도를 측정하였다. 이 때 배율은 200배로 확대하여 사용하였다. 또한 세포수를 측정하기 위해 세포의 움직임을 정지시키고, 세포를 염색하기 위해 에탄올과 요오드를 혼합한 용액을 배양액에 소량 주입하였다(17). 또 다른 방법으로는 80°C에서 12 시간 건조된 종이 필터를 이용한 건조중량법이 이용되었다. 세포내 chlorophyll 양을 분석하기 위해, 세포를 수확한 후, 90% 에탄올을 넣고 원심분리기에서 5분간 3000 x g로 회전시켜 chlorophyll 을 추출하였다. 전체 chlorophyll 양은 spectrophotometer (HITACHI, U-3210, Japan)를 사용하여 Spreitzer 법으로 측정되었다(17). 배양 중 발생하는 가스는 serum bottle에 포집되었으며, 수소 함량은 serum bottle의 head space에서 gas tight syringe로 0.1 mL 취한 후, gas chromatography (HP 5890, Hewlett-Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. 이 때 column은 carboxen-1000 (Supelco, USA)을 사용하였고, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 수소 가스의 분석조건은 column 온도 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C이었으며, carrier gas는 Argon으로 flow rate는 35 mL/min으로 유지하였다. 배양액 내에 잔존하는 황성분의 농도를 정량하기 위하여 Ion-chromatography (DIONEX, Model DX-500, USA)를 사용하여 황 성분의 농도를 관찰하였다. 이 때 사용된 분석 column은 음이온 column인 IONPAC AS4 (DIONEX, USA)를 이용하였다. Eluent는 sodium carbonate 0.19 g과 sodium bicarbonate 0.14 g을 1 L에 녹여 흘려주었고, 배양액을 공극 크기 0.2 μm filter에 여과한 후, 1 mL syringe에 0.1 mL 취하여 주입하였다.

결과 및 고찰

황성분 농도에 따른 수소생산

Chlamydomonas reinhardtii UTEX90 균주를 이용하여 황결핍시 잔여 황농도에 따른 수소생산량을 알아보기 위하여, 황결핍된 배양액에 MgSO₄ 용액을 농도별 (0, 15, 30, 60, 120 μM)로 재첨가하여 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 의 빛에서 140시간 동안 배양하였다. Fig. 1에서는 황결핍 후 다양한 농도의

MgSO₄ 용액을 재첨가하여, 황결핍 배양시간에 따른 수소 생산량을 나타내었다. 수소생산량은 황결핍 후 0~30 μM의 황성분을 재첨가해주었을 때까지는 순차적으로 증가하는 경향을 보였고, 이 때 최대 수소생산량은 30 μM의 MgSO₄ 용액을 재첨가해주었을 때 236 mL H₂/L culture였다. 하지만 60 μM의 황농도를 재첨가해주었을 때는 황성분을 첨가 해주지 않았을 때보다 오히려 수소생산량이 감소하였고, 황성분 120 μM을 재첨가하였을 때는 수소가 전혀 생산되지 않음을 확인할 수 있었다. 이렇게 황결핍시 재첨가된 MgSO₄의 농도에 따라 수소생산량이 달라지는 이유는 MgSO₄ 첨가 후 초기 24시간 동안 증가된 chlorophyll의 변화량(Fig. 2)과 재첨가된 MgSO₄가 황결핍된 배양액에서 소모되는 속도(Fig. 3)를 통해 알 수 있었다.

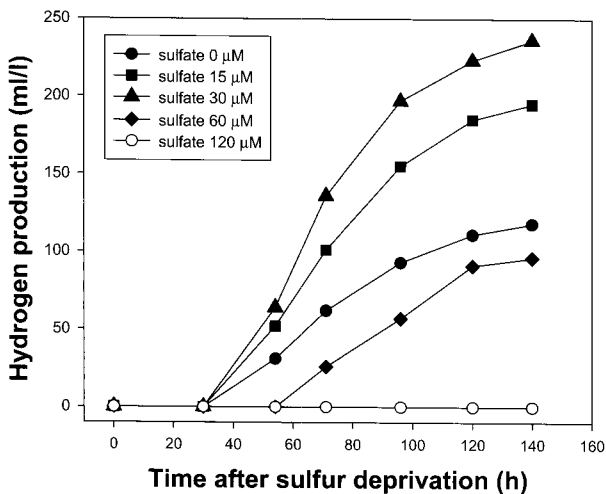


Figure 1. Effect of readded sulfate at t = 0 on total hydrogen production by sulfur deprived *C. reinhardtii* culture.

황결핍 초기 24시간 동안 변화된 chlorophyll의 증가량은 재첨가된 MgSO₄의 농도에 따라 0 μM에서 120 μM까지 순차적으로 증가하였다. 조류 세포내에서 chlorophyll의 역할은 광합성에 이용되는 빛 에너지를 모으는 것으로써, PS II에서 물분해를 통한 전자와 양성자와 산소를 생산하게 된다(18). 이때 생산된 전자의 약 80%가 혐기조건 때만 유도되는 hydrogenase 효소에 전달되어 수소를 생산하게 된다. 따라서 황결핍시 MgSO₄의 재첨가 농도가 높을수록 초기 chlorophyll 양이 증가되어, PS II에서 생산되는 전자의 양을 증가시키기 때문에 수소생산량 또한 증가한 것으로 사료된다. 그러나 MgSO₄ 60 μM을 재첨가해 주었을 때는 초기 24시간 동안 chlorophyll 증가량이 MgSO₄ 30 μM 첨가해준 것보다 더 높음에도 불구하고 수소생산량은 MgSO₄를 첨가하지 않았을 때보다 감소하였다. 이는 다소 높은 황농도 때문에 배지내의 황결핍이 지연되어, hydrogenase가 유도되는 시간과 전체 수소발생 시간이 줄어들어 황성분을 재첨가하지 않았을 때보다 수소생산량이 감소하는 것으로 사료된다(Fig. 1 and 3). 또한 MgSO₄를 120 μM 재첨가해주었을 때는 수소가 전혀 발생되지 않았다. 이는 Fig. 3에서 나타난 것처럼 첨가된 황농도가 매우 높아서 황결핍이 일어나지 않게 된다. 따라서 혐기 상태에서만 활성을 갖는

hydrogenase가 유도되지 않아 수소생산이 되지 않는 것으로 사료된다.

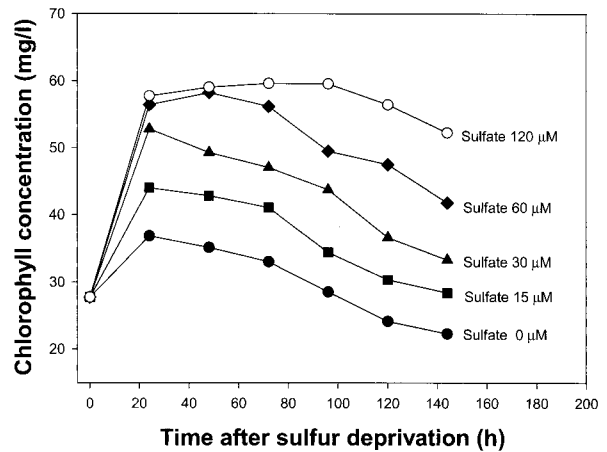


Figure 2. Changes in total cellular chlorophyll concentration depending on sulfate concentration.

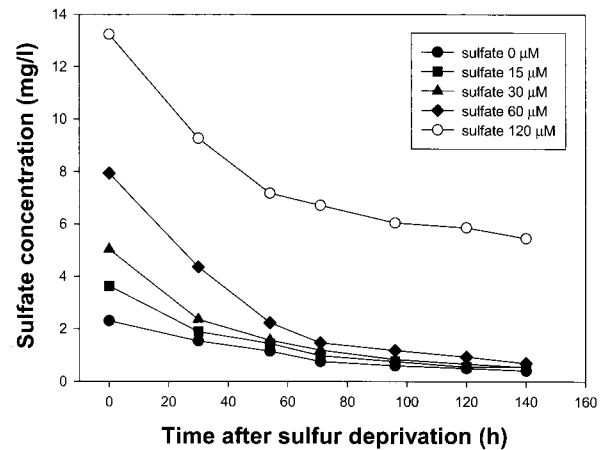


Figure 3. Change of residual sulfate after readdition of sulfate to sulfur depleted culture.

황성분 재첨가에 의한 연속적인 수소생산

예전 Melis 등의 보고에 의하면, 황결핍 조건을 이용한 수소생산은 배지 내에 미량의 황성분만 재첨가해도 수소를 재생산해낼 수 있었다(5). 이것은 황결핍 배지 내 미량의 황성분이 첨가되어 PS II의 잔여활성(초기 chlorophyll 농도의 증가)을 다시 유도하여, PS II에서 수소를 합성할 수 있는 전자를 재생산하기 때문인 것으로 사료된다(11). 따라서 우리는 앞서 행해졌던 황농도 최적화 결과에 따라, 수소생산성이 가장 높았던 MgSO₄ 30 μM을 황결핍 후 재첨가하여 연속적인 수소생산을 시도하였다. Fig. 4에서 보여준 것처럼 MgSO₄는 140시간마다 총 4번 첨가되어, 4회 연속적으로 수소생산을 달성하였다. 첫번째는 236 mL H₂/L culture의 수소가 발생하였고, 두번째는 200 mL H₂/L culture, 세번째는 137 mL H₂/L culture, 마지막으로 52 mL H₂/L culture의 수소가 발생되었고, 총 수소생산량은 625 mL H₂/L culture였다. 그러나 MgSO₄ 첨가 횟수가 늘어갈수록 수소생산량이 유지되는 것이 아니라 점점 감소하

는 것을 볼 수 있었다. 이렇게 수소생산량이 감소하는 이유는 chlorophyll의 분해 및 세포의 사멸과 pH의 증가 (약 8.6까지 증가) 때문인 것으로 사료된다.

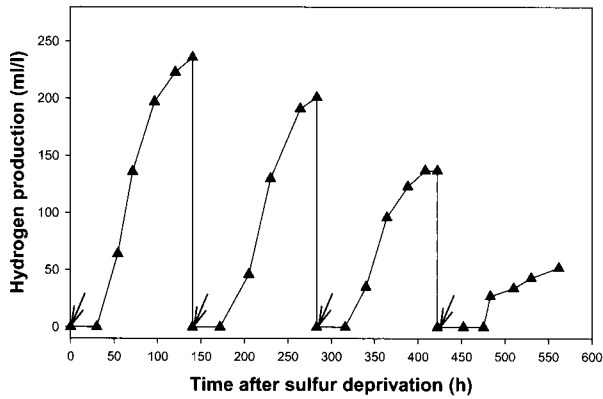


Figure 4. Continuous hydrogen production by sulfate readdition ($MgSO_4 = 30 \mu M$) under sulfur deprived condition. Arrows are adding time of sulfate.

황결핍 후 $MgSO_4$ 첨가시 chlorophyll 농도를 살펴보면, 초기 (0~24 h)에는 chlorophyll 농도가 증가했다가 시간이 지남에 따라 점차 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5). 140시간 동안 수소 발생이 끝난 후, 다시 $MgSO_4$ 를 첨가하면 chlorophyll의 농도가 첫번째와 같은 형태로 초기에 증가한 후 감소하는 것을 반복하였다. 그리고 전체 chlorophyll 농도는 배양시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다. 이러한 현상은 배양액내 세포 수의 경우에도 같은 경향성을 보였다. 여기서 주목할 점은, 배양시간이 경과됨에 따라 감소된 chlorophyll 농도와 세포수에 비례하여 수소생산량도 감소했다는 것이다. Melis 등의 연구에 의하면, 광합성에 의지하여 살아가는 생명체들은 강한 빛에 의해 광산화 손상 (Photo-oxidative damage)을 입어, PS II의 기능을 손상시킨다고 보고하였다(19). 이러한 현상이 일어나는 이유는 PS II의 초기 전자 수용체인 Q_A 가 환원된 상태에서는 PS II의 여기 에너지가 정상적으로 소산되지 못하고, 단일항 산소 (singlet oxygen)를 발생시키기 때문이다. 이러한 단일항 산소는 강한 반응성을 가지고 있기 때문에 광화학적 반응 중심의 chlorophyll을 파괴하게 되어 PS II가 파괴된다. 그러나 광합성 미생물들은 PS II의 기능을 회복시킬 수 있는 회복 기작을 가지고 있는데, 이 때 PS II의 복구를 위해서는 methionine과 cysteine 같은 황성분이 포함되어 있는 amino acid가 필요하게 된다. 하지만 배지내 황성분이 결핍된 조건에서는 PS II의 복구가 저해되어 단일항 산소에 의한 chlorophyll의 분해와 세포의 사멸이 배양시간이 길어지면 길어질수록 (560시간) 더욱 가속화되어, 수소생산에 영향을 미친 것으로 사료된다.

황결핍 시간이 지날수록 수소생산량이 점차 감소하는 또 다른 이유는 pH의 증가 때문인 것으로 사료된다. Fig. 6에서 보여준 것처럼, 황결핍 후 배양시간에 따른 pH 변화는 초기 7.2에서부터 최종적으로 8.6까지 증가하였다. Kosourov 등의 연구에 의하면, 조류 시스템에서 수소합성 효소인 Hydrogenase의 활성은 pH의 변화에 매우 민감하여,

배양액 내 pH가 매우 높거나 낮으면 그 활성이 저하된다고 알려져 있다(12)(최적 pH = 7.7). 따라서 배양시간이 지남에 따라 pH의 증가 때문에 hydrogenase의 활성이 저해되어, $MgSO_4$ 재첨가에 의한 수소생산시 그 생산성이 유지되지 못하고 점차 감소한 것으로 사료된다.

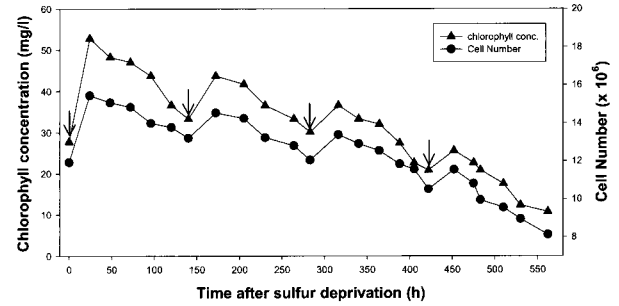


Figure 5. Changes of Chlorophyll concentration and cell number after sulfate readdition on continuous hydrogen production.

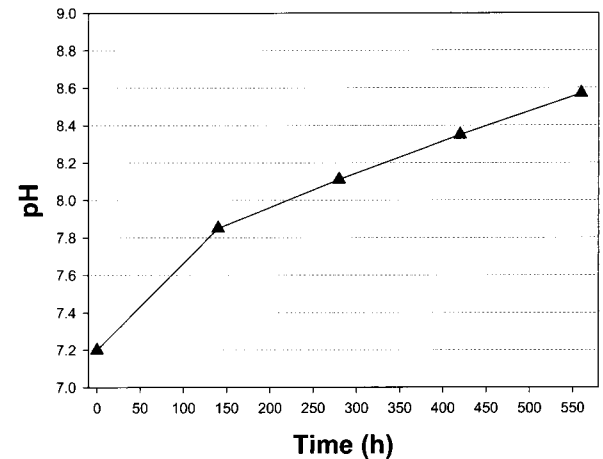


Figure 6. Change of pH after sulfate readdition on continuous hydrogen production.

요약

우리는 황결핍 환경에서 *C. reinhardtii*에 의한 수소생산성을 증진시키기 위해 황성분의 농도가 수소생산에 미치는 영향을 조사하였고, 그 결과를 이용하여 황 재첨가에 의한 연속적인 수소생산을 수행하였다. $MgSO_4$ 용액을 농도별 (0, 15, 30, 60, 120 μM)로 희석하여 황결핍 초기에 첨가하였을 때, 최적 황농도는 30 μM 로서 236 mL H_2/L culture를 생산하였다. 황결핍 시 황성분의 첨가는 PS II 활성화에 기여하여 hydrogenase가 수소합성에 이용할 수 있는 전자를 다량 발생시키기 때문이다. 그러나 초기에 첨가해 준 황농도가 너무 높으면, 황결핍 시간이 지남 ($MgSO_4$ 60 μM 의 경우) 되거나 황결핍이 일어나지 않기 ($MgSO_4$ 120 μM 의 경우) 때문에 hydrogenase가 유도되지 않는다. 따라서 수소생산량이 다른 농도에 비해 감소하거나 수소가 전혀 생산되지 않았다. 연속적인 수소생산을 위한 황성분 재첨가는 총 4회 수행되었고, 발생된 총 수소생산량은

625 mL H₂/L culture였다. 그러나 황성분을 재첨가해 줄 때마다 수소생산량은 점차 감소되었다. 이것은 황결핍 조건에서 단일항 산소에 의한 chlorophyll 파괴 및 세포 수의 감소, 또한 배양액 내의 pH의 증가 때문에 수소생산이 감소된 것으로 사료된다. 따라서 황결핍 조건에서 조류를 이용한 연속적인 수소생산 공정을 개발하기 위해서 황성분 첨가시기를 조절하여 세포의 사멸을 방지하고, 배양액내 pH 조절을 위한 다양한 buffer 첨가 실험 등 수소생산성을 지속적으로 유지할 수 있는 다양한 연구가 필요하다.

감 사

이 연구(논문)은 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업 (수소에너지사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Dunn, S. (2002), Hydrogen futures: toward a sustainable energy system, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 235-264.
- Dincer, I. (2002), Technical and exergetic aspects of hydrogen energy systems, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 265-285.
- Das, D. and V. Nejat (2001), Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *Int. J. Hydrogen Energy* **26**, 13-28.
- Gaffron, H. and J. Rubin (1942), Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae, *J. Gen. Physiol.* **26**, 219-240.
- Ghirardi, M. L., L. Zhang, J. W. Lee, T. Flynn, M. Seibert, E. Greenbaum, and A. Melis (2000), Microalgae: a green source of renewable H₂, *Trends Biotechnol.* **18**, 506-511.
- Hase, E., Y. Morimura, S. Mihara, and H. Tamiyama (1958), The role of sulfur in the cell division of *Chlorella*, *Arch. Microbiol.* **31**, 87-95.
- Zhang, L., T. Happe, and A. Melis (2002), Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga), *Planta* **214**, 552-561.
- Melis, A, L. Zhang, M. Forestier, M. L. Ghirardi, and M. Seibert (2000), Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* **122**, 127-135.
- Antal, T. K., T. E. Krendeleva, T. V. Laurinavichene, V. V. Makarova, A. A. Tsygankov, M. Seibert, and A. B. Rubin (2001), The relationship between the photosystem 2 activity and hydrogen production in sulfur deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells, *Biochem. Biophys. Mol. Biol.* **381**, 371-374.
- Antal, T. K., T. E. Krendeleva, T. V. Laurinavichene, V. V. Makarova, M. L. Ghirardi, A. B. Rubin, A. A. Tsygankov, and M. Seibert (2003) The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells, *Biochim. Biophys.* **1607**, 153-160.
- Kosourov, S., A. Tsygankov, M. Seibert, and M. L. Ghirardi (2002), Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* : Effects of Culture Parameters, *Biotechnol. Bioeng.* **78**, 731-740.
- Kosourov, S, M. Seibert, and M. L. Ghirardi (2003) Effect of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures, *Plant Cell Physiol.* **44**, 146-155.
- Kim, J. P., C. D. Kang, S. J. Sim, M. S. Kim, T. H. Park, D. H. Lee, D. J. Kim, J. H. Kim, Y. K. Lee, D. Pak (2005) Cell age optimization for hydrogen production induced by sulfur deprivation using a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90, *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 131-135.
- Tsygankov, A., S. Kosourov, M. Seibert, M. L. Ghirardi (2002) Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1239-1244.
- Laurinavichene, T., I. Tolstygina, A. Tsygankov (2004) The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biotechnol.* **114**, 143-151.
- Gong, Gyeong Taek, Sang Jun Sim, Daewon Pak, Mi Sun Kim, and Tai Hyun Park (2003), Optimization of organic compounds and hydrogen production in dark fermentation using *Chlamydomonas reinhardtii*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 51-57.
- Harris, E. H. (1989), *The Chlamydomonas sourcebook*, p607-608. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA.
- Hopkins, W. G. and N. P. A. Huner (2004), *Introduction to plant physiology*, 3rd ed., p63-166, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Melis, A. (1999), Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*?, *Trends Plant Sci.* **4**, 130-135.