

## *Rhodopseudomonas sphaeroides*의 고정화균체에 의한 수소생산의 효율적 기질공급

김진상<sup>1\*</sup> · 홍용기<sup>2</sup> · 신일식<sup>3</sup> · 조학래<sup>3</sup> · 장동석<sup>3</sup>

부산수산대학교 <sup>1</sup>미생물학과, <sup>2</sup>생물공학과, <sup>3</sup>식품공학과

## Effective Supply of Substrate for Hydrogen Production by Immobilized Cells of *Rhodopseudomonas sphaeroides*

Kim, Jihn-Sang<sup>1\*</sup>, Yong-Ki Hong<sup>2</sup>, Il-Sik Sin<sup>3</sup>,  
Hak-Rae Cho<sup>3</sup> and Dong-Suk Chang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, <sup>2</sup>Department of Biological Science and Technology,

<sup>3</sup>Department of Food Science and Technology,

National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

**Abstract** — The Photosynthetic bacterium, *Rhodopseudomonas sphaeroides* strain B6 was immobilized on agar gel. The optimum concentration of agar for hydrogen production was 2% (w/v). Maximum rates of hydrogen production by immobilized (300 ml of gel; 2.85 mg dry cells/ml) and free cells (1l culture; 0.87 mg dry cells/ml) were 47.5 and 48.0 ml/hr/culture, respectively. However, when both cultures were fed by 10 mmoles of lactate as limited electron donor at the later period of incubation, the activity of hydrogen production by free cells was significantly decreased but, immobilized cells continued hydrogen production with almost the same initial rate. We examined hydrogen production by immobilized cells of strain B6 under periodic illumination for 12 hr-intervals. When the culture was periodically fed by basal medium containing 9.3 mmoles of DL-lactate and 1.86 mmoles of L-glutamate as consumed electron donor and nitrogen source, respectively, for every one liter of hydrogen produced, hydrogen was evolved continuously with the average rate of 510 ml/day/300 ml gel (2.9 mg dry cells/ml) during the incubation time for 228 hr.

수소는 이상적인 에너지자원의 하나로 고려되고 있으며, 광합성세균은 광에너지를 이용하여 수소를 생산하는 활성을 가진다. 광합성세균의 광의존 수소생산은 1949년 Gest와 Kamen(1)에 의해 처음으로 발견된 이래, 여러 연구자들에 의해 새로운 대체 에너지 생산의 잠재적인 한가지 방법으로서 발전되어 왔다(2-4).

광학성세균 중에서 홍색비유황세균은 균체내의 광화학기구(photosystem I)와 효소 nitrogenase계에 의해 여러가지의 유기화합물로부터 수소를 생산하며,

이들 세균은 특히 lactate와 glutamate를 각기 탄소원 (또는 전자공여체)과 질소원으로 한 혐기-광조사 조건으로 증식할 때 높은 수소생산 속도를 나타내었다(5,6). 저자 등은 lactate와 glutamate 함유 액체배지를 이용하여 *Rhodopseudomonas sphaeroides*에 의한 실험실조건의 연속배양(7) 및 옥외반연속배양(8)을 실시하여 연속적 수소생산의 가능성에 대하여 보고하였다. 그러나, 항시 가변적인 옥외조건에 있어서 보다 효율적인 기질의 이용과 배양의 조절을 위하여는 일정한 수소생산량에 소비된 만큼의 기질을 주기적으로 공급하는 배양법이 유효할 것으로 생각되며, 이에 대한 시험은 아직 시도되지 않았다.

일반적으로 생세포계는 그 안정성에 제한을 받으며,

**Key words:** Hydrogen production, substrate supply, immobilized *R. sphaeroides* cells

\*Corresponding author

더우기 수소생산 관련효소인 nitrogenase는  $O_2$ 에 대해 극도로 불안정하다. 고정화 미생물세포는 비고정화세포에 비해 효소활성에 있어서 보다 높은 안정성을 나타내고, 때로는 높은 효율이 얻어지는 것이 논증되었다(9, 10). 광합성세균을 agar gel(11-14)이나 alginate 또는 carrageenan beads(15, 16)에 고정하여 수소생산을 시험한 내용은 보고되어 있으며, Felten 등(17)은 *Rhodospirillum rubrum* 세포를 여러가지의 고분자담체에 고정하여 수소생산성과 안정성을 비교한 결과 agar가 최상의 고화제임을 보고하였다.

본 연구에서는 *R. sphaeroides* B6의 액체배양과 agar gel에 포괄한 증식균체에 있어서 수소생산의 지속성을 비교하는 한편, B6의 고정화세포를 이용하여 12시간 주기의 광조사 조건으로 일정한 수소생산량에 상응하여 주기적으로 기질을 공급하는 배양조건에 대하여 조사한 내용을 보고코져 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

본 실험에서는 저자 등이 태국의 Bangkok 주변에서 분리·동정한 *Rhodopseudomonas sphaeroides* B6(18)를 사용하였고, Ormerod 등(19)의 최소배지를 전보(20)에서와 같이 수정하여 기본배지로 사용하였다.

### 배양방법

모든 배양은  $33^\circ\text{C}$ 에서 혐기-광조사 조건으로 전보(20)에서와 같은 방법으로 실시하였다.

### 균체의 고정화

균체의 고정화조건 조사를 위하여는 5 mM의 sodium L-glutamate와 25 mM의 sodium DL-lactate 함유 기본배지(GL 기본배지)에 증식한 대수증식기 후기세포( $A_{660\text{nm}}=0.7\sim0.8$ )를  $8,000\times g$ , 10분 원심집균하여 25 mM의 DL-lactate 함유 기본배지에 2회 세척한 후, 세척시와 같은 배지에 균체를 현탁하였다. 균현탁액(0.32 mg dry cells/ml) 20 ml씩을, agar(Difco)를 0.5g, 1.0g, 2.0g씩 각기 첨가하여 멸균액화한 기본배지 30 ml와  $48^\circ\text{C}$ 에서 혼합한 후, 160 ml 용량의 유리배양용기(수광면:  $11\text{ cm}\times 4\text{ cm}$ , 광투과깊이: 4 cm)에 주입하여 수광면에 gel 평판이 형성되게 실온에서 고화시켰다.

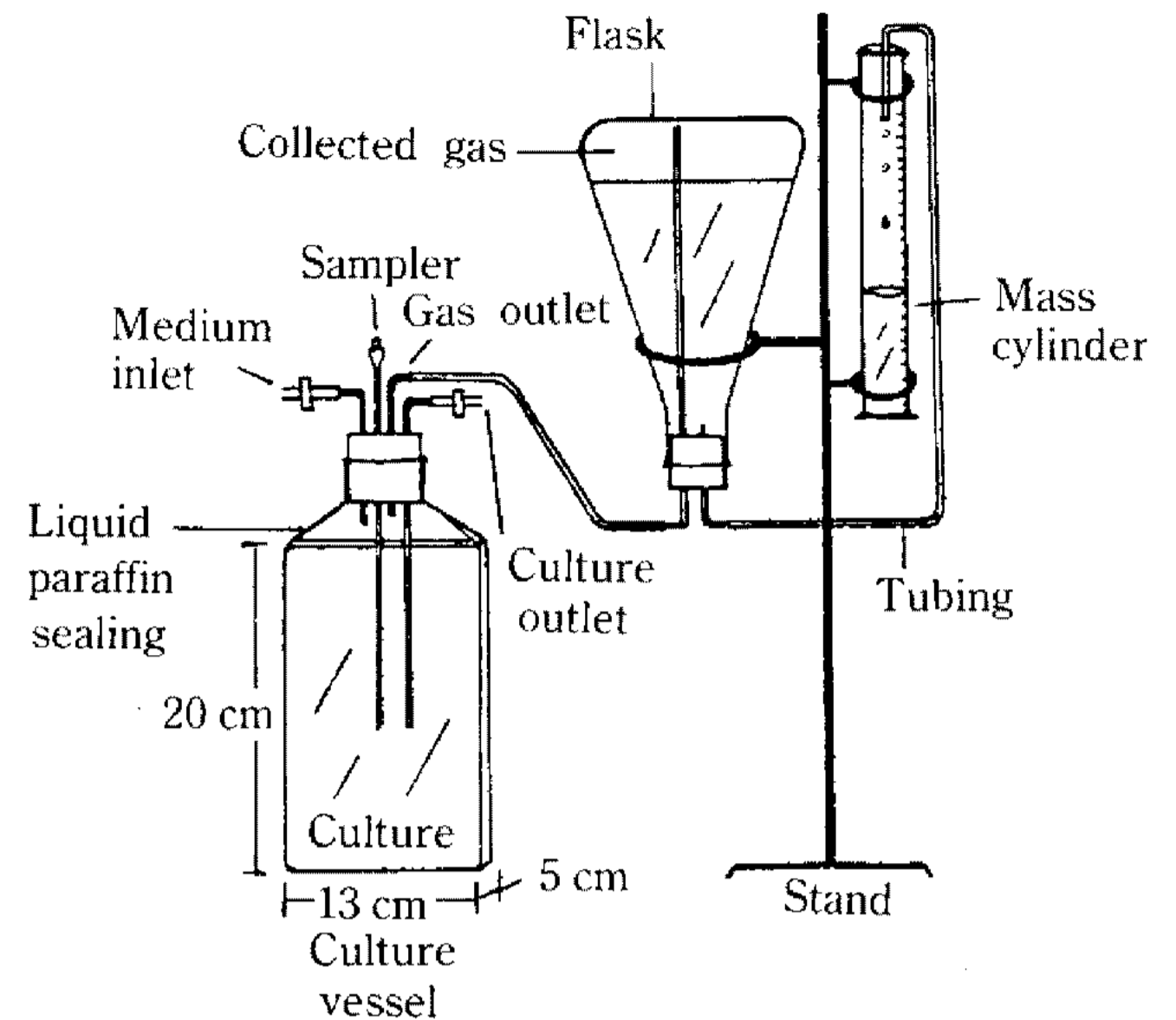


Fig. 1. Culture apparatus for hydrogen production.

고체배양과 액체배양의 비교 및 기질공급 조건 조사를 위하여는 10 mM의 ammonium sulfate와 30 mM의 DL-lactate 함유 기본배지에 증식한 대수증식기 균체를 원심집균하여, 25 mM의 DL-lactate 함유 기본배지에 세척·현탁하였다. 균현탁액(1.05 mg dry cells/ml) 100 ml와 6g의 agar를 첨가하여 멸균액화한 25 mM의 DL-lactate 함유 기본배지 200 ml를 잘 혼합하여 배양용기(Fig. 1)에 주입한 후, 수광면에 gel 평판이 형성되게 실온에서 고화시켰다.

### 수소생산 측정

균체고정화 조건 조사에는 균체를 포괄한 agar gel (50 ml) 평판 함유 배양용기(3조)에 25 mM의 DL-lactate 함유 기본배지 100 ml씩을 gel이 침적되게 주입하고, 배양액 표면을 액체 paraffin으로 피복하여  $33^\circ\text{C}$ 에서 약 10 klux로 광조사 배양하였다. 배양에 의해 생성되는 수소의 양은 배양용기의 상부에 설치한 가스출구를 50 ml 주사기와 연결하여 압력변화에 의해 측정하였다.

고정화균체(고체배양)와 비고정세포(액체배양)에 의한 수소생산 비교실험에는 Fig. 1과 같은 배양장치를 이용하였다. 1.3l 용량의 유리용기에 가스출구, 배지 주입구 및 배출구 그리고 배양액 채집구를 설치하였고, 증류수를 채운 역위 삼각프라스크(1l 용량)를 가스출구와 연결하였다. 액체배양은 GL 기본배지 1l를 배양용기에 주입하고, 동조성의 배지에 증식한 균체(정상기)를 접종( $A_{660\text{nm}}=0.03$ )하여 배양액표면을 액

체 paraffin으로 피복한 후, 33°C에서 약 30 klux의 연속광조사 조건으로 배양하였다. 고체배양은 균체를 포괄한 agar gel 평판(300 ml)을 함유하는 배양용기의 기상부를 N<sub>2</sub>가스로 치환한 후, 33°C에서 광조사(약 10 klux)하여 48시간 배양하였다. N<sub>2</sub>가스에 의해 세포 중의 nitrogenase가 충분히 유도된 후, GL 기본배지 1l를 gel이 침적되게 주입하고, 상부표면을 액체 paraffin으로 피복하여 액체배양과 같은 방법으로 배양하였다. 배양에 의해 생산되는 수소의 양은 고·액배양 모두 역위 삼각프라스크에 의한 물치환으로 측정하였다. 양배양에 있어서 필요시에 2 mmole의 L-glutamate와 10 mM의 DL-lactate 함유 기본배지 200 ml를 동량의 배양액과 교체하여 공급하였다.

고정화균체에 의한 수소생산의 기질공급조건 조사 실험에는 상술한 것과 같은 배양장치(Fig. 1) 2조를 준비하여 이용하였고, 전기의 고체배양과 같은 방법으로 배양하여 수소생산을 측정하였다. 단, N<sub>2</sub>가스에 의해 nitrogenase를 유도한 후, 2 mmole의 L-glutamate와 10 mmole의 DL-lactate 함유 기본배지 1l를 gel이 침적되게 각 배양조에 주입하여 배양을 시작하였고, 광조사는 12시간 주기로 실시하였다. 배양 후 매 1l의 수소생산시 마다 한 배양조에는 1.86 mmole의 L-glutamate와 9.3 mmole의 DL-lactate를 첨가한 기본배지 200 ml씩을, 다른 한 배양조에는 동량의 기질을 함유하는 기본배지 400 ml씩을 주기적으로 배양액과 교체공급하였다.

### 분석

제조건의 배양에 의해 생산되는 수소는 적당한 시간간격으로 가스분석용 주사기에 의해 배양조의 기상부에서 가스시료(100 μl)를 채취하여 전보(20)와 같은 조건으로 gas chromatograph(Shimadzu, model GC-8A, Japan)에 의해 분석하였다.

세포증식은 spectrophotometer(Spectronic 20, Milton Roy Co. U.S.A.)에 의해 660 nm의 흡광도를 측정하였고, 건조균체는 표준곡선과 비교하여 환산하였다. 고정화균체의 정량은 세포를 포괄한 agar gel을 균일하게 파쇄하여 증류수에 침적하고, 유리세포를 추출·여과(여지: Toyo No. 2)한 후, 여액을 8,000 ×g, 10분 원심집균하여 증류수로 2회 세척·현탁한 후, 105°C, 12시간 건조하여 건조량을 측정하였다.

광조사 강도는 Topcon photocell illuminometer

(model SPI-71, Tokyo Kikai, K.K., Japan)에 의해 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 균체의 고정화 조건

광합성세균의 고정화균체에 의한 수소생산에 있어서 적정 agar 농도를 알기 위하여, 농도를 달리한 agar gel 중에 *R. sphaeroides* B6의 균체를 포괄한 후, DL-lactate를 전자공여체로 하여 혐기·광조사 조건으로 수소생산을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 2%(w/v)의 agar gel 중에 세포를 고정했을 때 최대의 수소생산속도를 나타내었고, 4% agar 농도에서는 활성이 크게 약화되었다. 또한 2%의 agar gel에 고정된 세포의 수소생산활성은 비고정세포에 비해 더 높았다. 비록 1%와 2% agar간에 수소생산속도의 차이는 그다지 크지 않았지만 gel 평판의 탄력이나 강도에 있어서 2%쪽이 더 양호하며 장기간 사용에 유리한 것으로 판단되었다. 따라서, 이후의 균체고정 실험에는 2%의 agar gel을 사용하였다.

### 고정화균체와 비고정세포의 수소생산성

수소생산의 지속성 및 배양의 안정성을 알기 위하여 B6의 2% gel 고정화균체(고체배양)와 비고정세포(액체배양)에 있어서 저농도의 기질공급에 따른 수소생산성을 비교하였다. 양배양에 있어서 수소생산 또는 균체증식(액체배양)의 경과과정은 Fig. 2와 같다. 액체배양의 경우는 균체증식과 더불어 약 24시간의 지체기를 거쳐 수소생산이 개시되었고, 고체배양에서

**Table 1. The effect of agar concentration on hydrogen production by immobilized cells of *R. sphaeroides* B6**

| Concentration of agar (%) | Hydrogen production                |                               |
|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
|                           | Production rate (μl/hr/ml culture) | Total production (ml/culture) |
| 0                         | 18                                 | 54.3                          |
| 1                         | 22                                 | 62.4                          |
| 2                         | 26                                 | 69.3                          |
| 4                         | 16                                 | 33.0                          |

Hydrogen production was determined with the cultures containing 50 ml of gel (0.128 mg dry cells/ml) and free cell suspension (0.128 mg dry cells/ml). Total hydrogen production was measured after incubation for 64 hr.

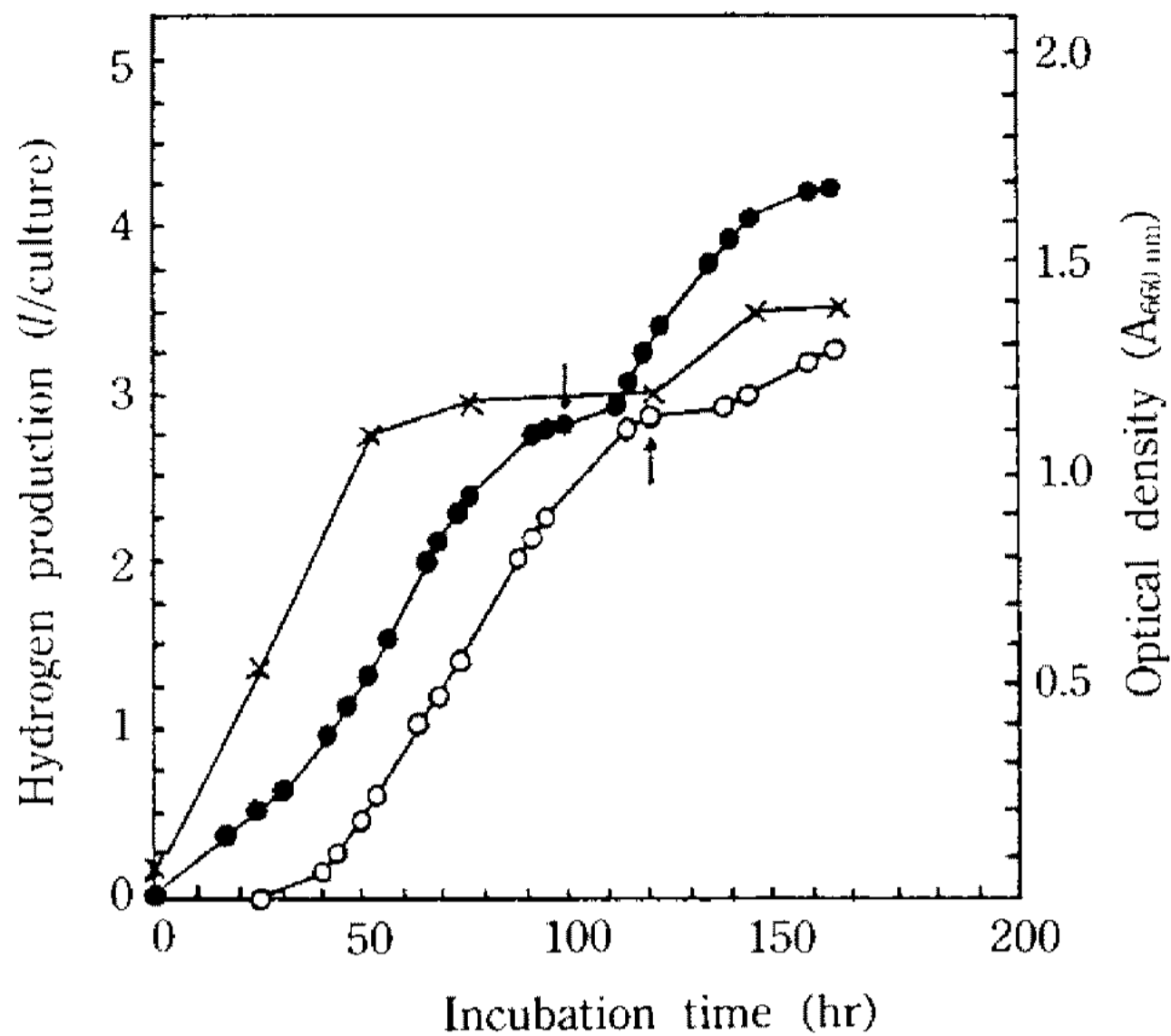


Fig. 2. Hydrogen production by immobilized and free cells of *R. sphaeroides* B6.

Symbols: Hydrogen production by the cultures of immobilized (●-●) and free cells (○-○). Optical density of the culture of free cells (×-×). Arrows (↓, ↑) indicate the times of replacement of the spent medium with fresh medium.

는 고정화균체의 활성으로 인하여 배양 후 지체없이 수소생산이 시작됨을 알 수 있다. 교체배양의 경우는 300 ml의 gel(2.85 mg dry cells/ml gel), 액체배양은 1,000 ml의 배양액(수소생산기간 중 기질공급 전의 평균 균농도: 0.87 mg dry cells/ml)으로 실시되었고, 기질공급 전의 최고 수소생산속도는 거의 같았다(Table 2). 그러나, 수소생산이 거의 멈춘 배양후기에 10 mmole의 제한된 lactate의 공급에 의해 액체배양의 경우, 최고 수소생산속도가 20 ml/hr/culture로서 교체배양이 44 ml/hr/culture인데 비해 활성의 약 55%가 감소되었다(Fig. 2). 전배양기간(165 hr) 동안 액체배양으로부터는 3.285l, 교체배양에서는 4.227l의 수소가 생산되었다(Table 2).

보다 고농도의 기질공급시에는 본 균주의 경우 액체배양에 의한 배지의 교체공급으로 연속적 수소생산이 가능하였지만(8), 여기서 기질의 제한공급에 대한 수소생산의 영향을 본 것은 일정한 수소생산량(예: 1l)에 소비된 만큼의 기질을 주기적으로 공급했을 때 수소생산의 지속성을 알기 위한 때문이다. 본 실험의 결과는 약 1l의 수소생산량에 가까운 10 mmole의 저농도 기질(lactate) 공급에 있어서 교체배양이 액체배양보다 회복된 활성이 높고 지속적인

Table 2. Summary of hydrogen production by immobilized and free cells of *R. sphaeroides* B6

| Culture condition | Duration time of culture (hr) | Maximum rate of H <sub>2</sub> production (ml/hr/culture) | Total H <sub>2</sub> production (ml/culture) |
|-------------------|-------------------------------|---|--|
| Immobilized cells | 165                           | 48.0  | 3285   |
| Free cells        | 165                           | 47.5  | 4227   |

Hydrogen production was measured with 300 ml of gel (2.85 mg dry cells/ml) and 1000 ml culture of free cells (0.87 mg dry cells/ml) under 30 klux and anaerobic condition at 30°C.

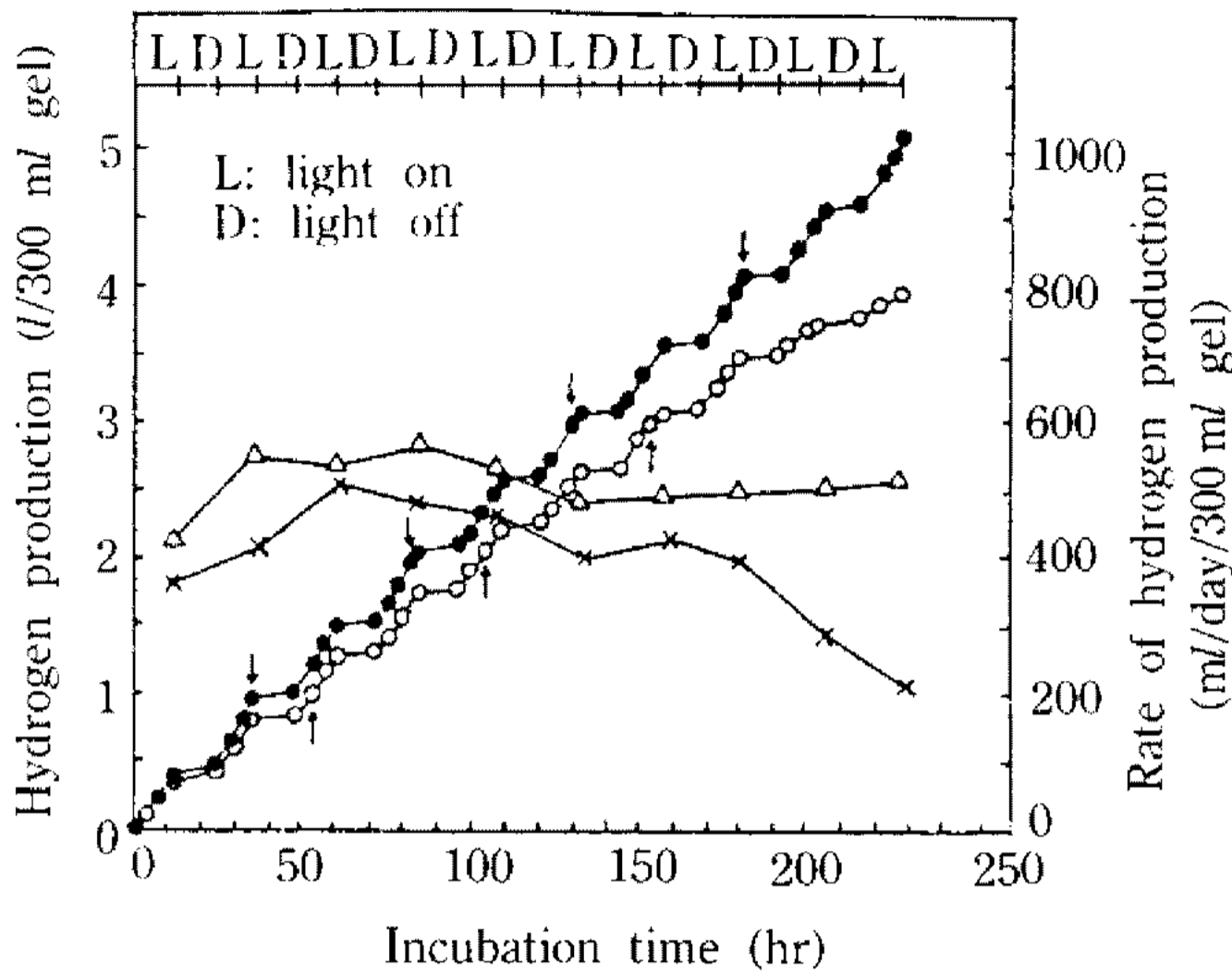
수소생산성을 나타내어 연속적 수소생산에 유리한 것으로 나타났다.

### 수소생산을 위한 효율적 기질공급

옥외 반연속배양의 자동화를 위한 전단계 실험으로서 *R. sphaeroides* B6의 고정화균체를 이용하여 자연광 이용조건에 가까운 12시간 주기의 광조사 조건으로 일정량의 수소생산에 소비된 만큼의 기질함유 배지를 공급하여 연속적 수소생산 실험을 실시하였다. 이때, 배지의 적정 교체량을 알기 위하여 300 ml의 gel(2.9 mg dry cells/ml gel) 평판을 각기 함유하는 2조의 배양을 준비하여 1조에는 200 ml의 배지(배양A)를, 다른 1조에는 400 ml의 배지(배양B)를 공급하였다. 이는 기질을 보다 효율적으로 남김없이 수소생산에 이용함과 동시에 상시 가변적인 태양광 이용조건에 대응하기 위한 배양방법으로서 수소생산량에 상응하여 기질을 자동공급하는 배양시스템의 실현 가능성을 알기 위한 모델실험으로 실시된 것이다.

1 mole의 lactate로부터 6 mole의 수소가 생성되는 이론식( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 3\text{H}_2\text{O} = 6\text{H}_2 + 3\text{CO}_2$ )으로부터 산출하면, 1l의 수소는 7.44 mmole의 lactate에 상당한다. 균체생육 유지에 약 20%의 기질이 소모되는 것으로 보면, 1l의 수소생산당 9.3 mmole의 lactate가 필요하다. 또한, *R. sphaeroides*의 수소생산을 위한 배지의 최적 C/N ratio(lactate/glutamate)가 5였으므로(20), 질소원으로서 1.86 mmole의 glutamate가 필요하다. 그러므로 본 실험에서는 매 1l의 수소생산당 9.3 mmole의 DL-lactate와 1.86 mmole의 L-glutamate를 첨가한 기본배지를 공급하였다.

Fig. 3에서 알 수 있듯이 수소는 광조사시에만 생산되어 양배양 모두 계단식으로 증가되었다. 명암의



**Fig. 3. Hydrogen production by immobilized cells of *R. sphaeroides* B6 under 12 hr-interval illumination.**  
 Symbols: Total hydrogen production from the cultures by supplement with 200 ml (○-○) and 400 ml (●-●) of basal medium containing 9.3 mmoles of DL-lactate and 1.86 mmoles of L-glutamate. Time courses of hydrogen production rate from the cultures by supplement with 200 ml (×-×) and 400 ml (△-△) of basal medium. Arrows (↓, ↑) indicate the times of replacement of the spent medium with fresh medium.

반복조건에도 불구하고 배양B는 평균 510 ml/day/300 ml gel의 속도로 수소생산이 지속되었다. 그러나, 배양A는 배양후기에 수소생산량이 점차 저하되었고, 이러한 경향은 수소생산속도의 변화에도 현저하였다. 배양기간 동안(228 hr) 생산된 수소의 전량은 배양A가 3,976 ml, 배양B가 5,120 ml였다. 본 실험조건에 있어서 안정된 연속적 수소생산에는 매 1l의 수소생산당 소비된 만큼의 전자공여체를 함유하는 배지 400 ml씩을 공급함이 유효하였다.

이 결과는 광합성세균의 광의존 수소생산에 있어서 보다 효율적인 기질의 이용과 더불어 항상 가변적인 자연광 이용조건에 대응되는 자동반연속배양 시스템 구성의 가능성을 시사하는 것이다.

**요 약**

*Rhodospseudomonas sphaeroides* B6 세포를 agar gel 중에 고정했을 때, 수소생산을 위한 최적 agar 농도는 2%(w/v)였다. B6의 2% agar gel 고정화균체(300 ml gel : 2.85 mg dry cells/ml)와 비고정세포(1l culture : 0.87 mg dry cells/ml)에 있어서 초기의 최고 수소

생산활성은 각각 47.5 및 48.0 ml/hr/culture로 거의 같았다. 그러나, 수소생산이 거의 정지된 배양후기에 lactate의 제한공급(10 mmole)에 의한 비고정세포의 활성회복은 50% 이하로 감소되었지만, 고정화세포의 활성은 거의 초기상태로 회복되었다.

B6의 고정화균체를 이용하여 12시간 주기의 광조사 조건으로, 매 1l의 수소생산시 마다 그에 소비된 만큼의 기질에 상당하는 9.3 mmole의 DL-lactate와 1.86 mmole의 L-glutamate 함유 기본배지를 주기적으로 공급한 결과, 228시간의 배양기간 동안 명암의 반복 조건에도 불구하고 평균 510 ml/day/300 ml gel(2.9 mg dry cells/ml)의 속도로 수소생산이 지속되었다. 이 결과는 광합성세균에 의한 수소생산에 있어서, 보다 효율적 기질공급과 가변적인 태양광 이용 조건에 대응되는 자동배양 시스템의 구성 가능성을 시사한다.

**감사의 말**

본 연구는 1986~1989년도 한국과학재단의 목적기 초연구비 지원에 의해 수행되었으며, 재단 당국의 지원에 깊이 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Gest, H. and D. Kamen. 1949. Phtoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science* **109**: 558-559.
2. Weaver, P.F., S. Lien and M. Seibort. 1980. Photobiological production of hydrogen. *Solar Energy* **24**: 3-45.
3. Zürrer, H. 1982. Hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Experientia* **38**: 64-66.
4. Mitsui, A., E.J. Philips, S. Kumazawa, K.J. Reddy, S. Ramachandran, T. Matsunaga, L. Haynes and H. Ikemoto. 1983. Progress in research toward outdoor biological hydrogen production: Using solar energy, sea water, and marine photosynthetic microorganisma. *Ann. Rev. New York Acad. Sci.* **413**: 514-530.
5. Hillmer, P. and H. Gest. 1977. H<sub>2</sub> Metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H<sub>2</sub> production by growing cultures. *J. Bacteriol.* **129**: 724-731.
6. Kim, J.S., K. Ito and H. Takahashi. 1980. The relationship between nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Rhodospseudomonas palustris*.

- Agric Biol. Chem.* **44**: 827-833.
7. Kim, J.S., K. Ito, K. Izaki and H. Takahashi. 1987. Production of molecular hydrogen by a continuous culture under laboratory conditions. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2591-2593.
  8. Kim, J.S., K. Ito, K. Izaki and H. Takahashi. 1987. Production of molecular hydrogen by a semi-continuous outdoor culture of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1173-1174.
  9. Jack, T.R. and J.E. Zajic. 1977. The immobilization of whole cells. Pp. 125-145. In T.K. Ghose, A. Fiechter and N. Blakebrough (ed.). *Adv. Biochem. Engng.* Vol. 5.
  10. Chibata, I. and T. Tosa. 1977. Transformations of organic compounds by immobilized microbial cells. *Adv. Appl. Microbiol.* **22**: 1-17.
  11. Bennett, M.a. and H.H. Weetall. 1976. Production of hydrogen using immobilized *Rhodospirillum rubrum*<sup>1</sup>. *J. Solid-Phase Biochem.* **1**: 137-142.
  12. Vincenzini, M., R. Materassi, M.R. Teredici and G. Florenzano. 1982. Hydrogen production by immobilized Cells-II. H<sub>2</sub>-Photoevolution and waste water treatment by agar-entrapped cells of *Rhodomonas palustris* and *Rhodospirillum mollicianum*. *Int. J. Hydrogen Energy.* **7**: 725-728.
  13. Miyake, J., X. Mao and S. Kawamura. 1984. Photoproduction of hydrogen from glucose by a co-culture of a photosynthetic bacterium and *Clostridium butyricum*. *J. Ferment. Technol.* **62**: 531-535.
  14. Mitsui, A., T. Matsunaga, H. Ikemoto and B.R. Renuka. 1985. Organic and inorganic waste treatment and simultaneous photoproduction of hydrogen by immobilized photosynthetic bacteria. *Dev. Ind. Microbiol.* **26**: 209-222.
  15. Karube, I., H. Matsuoka, H. Mrata, K. Kajiwara and S. Suzuki. 1984. Large-scale bacterial fuel cell using immobilized photosynthetic bacteria. *Ann. New York Acad. Sci.* **434**: 427-436.
  16. Francou, N. and P.M. Vignais. 1984. Hydrogen production by *Rhodopseudomonas capsulata* cells entrapped in carrageenan beads. *Biotech. Letters.* **6**: 639-644.
  17. Felten, P. von, H. Zürrer and R. Bachofen. 1985. Production of molecular hydrogen with immobilized cells of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 15-20.
  18. Watanabe, K., J.S. Kim, K. Ito, L. Buranakarl, T. Kampee and H. Takahashi. 1981. Thermostable nature of hydrogen production by non-sulfur purple photosynthetic bacteria isolated in thailand. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 217-222.
  19. Ormerod, J.G., K.S. Ormerod and H. Gest. 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria: Relationships with nitrogen metabolism<sup>1</sup>. *Arch. Biochem. Biophys.* **94**: 449-463.
  20. Kim, J.S., Y.K. Hong, I.S. Sin, H.R. Cho and D.S. Chang. 1991. Optimum culture conditions for hydrogen production of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 179-185.

(Received November 5, 1991)