

각종 혐기성 미생물 발효에 의한 유기산 및 수소생산

김미선*, 윤영수*, 심상준**, 박태현***, 이정국****

*한국에너지기술연구원 바이오매스 연구팀, **성균관대학교 화학공학과,

서울대학교 응용화학부, *서강대학교 생명과학과

Hydrogen and Organic Acids Production by Fermentation Using Various Anaerobic Bacteria

MI-Sun Kim*, Yoon, Y. S.*, Sim, S. J.**, Park, T. H.*** and Lee, J. K.****

*Biomass Research Team Korea Institute of Energy Research.

**School of Chemical Engineering, SungKyunKwan Univ.

Seoul National Univ, * Sogang Univ.

71-2 Jang Dong, Yusung-Ku, Dae-Jeon 305-343

ABSTRACT

Clostridium butyricum, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus acidophilus*, AI-9 produced hydrogen and /or organic acids using glucose, lactose and starch at the anaerobic culture conditions. *Cl. butyricum* NCIB 9576 evolved 1,700 ml H₂/L-culture broth and accumulated butyric acid, acetic acid, propionic acid and ethanol in its culture broth when lactose was used as a carbon source during 24 hrs of fermentation. *L. amylovorus* ATCC 33620 accumulated lactic and acetic acids and some reducing sugars when starch was used as a carbon source without hydrogen production. Instead of starch as a carbon source, *L. amylovorus* ATCC 33620 produced lactic acid from algal biomass during fermentation and the acid-heat or freeze-thaw pretreatment of algal biomass accelerate the lactic acid fermentation.

주요기술용어 : Biological hydrogen(생물학적 수소), Anaerobic bacteria(혐기성 세균), Organic acids(유기산), Lactic acid bacteria (젖산균), Fermentation(발효)

1. 서 론

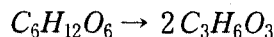
장기적인 화석연료 사용에 의한 지구온난화는 현재 사회가 안고 있는 심각한 환경문제로써, 이산화탄소의 제거 및 이산화탄소 배출을 저감하는

에너지원의 개발이 시급하다. 미세조류에 의한 이산화탄소 고정은 환경 친화적이고 환경문제의 심각성을 완화 할 수 있는 기술로 주목을 받고 있다. 미세조류는 이산화탄소를 고정한 후 자체가 바이오매스로 축적되고 이러한 바이오매스는 쉽

계 이산화탄소로 전환된다. 이로 인하여 미세조류 바이오매스를 자원화 할 수 있는 재생기술의 확보 됨으로써 궁극적으로 이산화탄소를 저감할 수 있는 기술로 정착할 수 있다.

수소는 화석연료를 대체할 수 있는 대체에너지이며, 또한 청정에너지이다. 수소제조에 한 방안으로서 이산화탄소를 미세조류에 의해 고정하고 생산된 미세조류인 바이오매스를 광합성 박테리아가 이용하므로써 수소를 생산하는 생물학적 수소생산 기술을 개발하고 있다. 그러나 광합성 박테리아가 미세조류 바이오매스를 직접 이용하여 수소를 생산하는 과정은 효율이 낮기 때문에 미세조류 바이오매스를 적절한 전처리기술을 개발하여, 미세조류 바이오매스로부터 광합성 박테리아에 의한 수소생산을 용이하게 하는 것이 필요하다. *Clostridium* 속의 혐기세균은 분해할 수 있는 유기물질 종류의 범위가 넓으며, 또한 분해력이 우수한 것으로 보고되고 있다. 포도당으로부터 이 균주는 혐기발효 중에 유기산, 수소, 이산화탄소를 발생하며(1,2,3), 일반적으로 Lactic bacteria

는 포도당을 기질로 하여 혐기 최적 발효조건에서 아래식과 같이, 수소 생산 없이 최대 2 mol lactic acid를 생산한다.



Lactic bacteria 중에서도 *L. amylovorus*는 전분 분해력이 높아서 세포벽 등 전분함량이 높은 바이오매스 분해에 적용될 수 있다. 하수 처리장 메탄 소화조에는 다양한 혐기 미생물이 존재하며, 소화조 내에 존재하는 산생성 박테리아는 유기물의 분해력도 높고 동시에 수소를 생산하는 것으로 보고되고 있다(8).

본 연구에서는 *Clostridium butyricum*, lactic acid bacteria, 하수 처리장 메탄 소화조에 존재하는 미생물 군집체 및 이 미생물 군집체에서 분리된 순수 혐기미생물을 이용하여 바이오매스로부터 유기산 생산과 동시에 수소발생을 위한 전처리 조건을 연구하였다.

2. 실험방법 및 재료

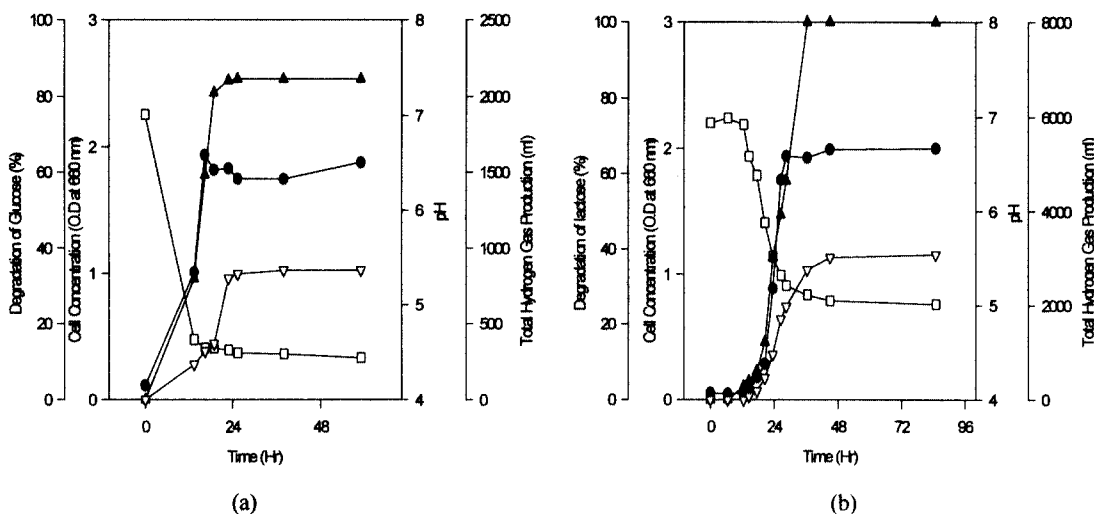


Fig. 1. Anaerobic fermentation patterns of *Clostridium butyricum* NCIB 9576 using glucose and lactose. cultures were anaerobically grown in 1.3 l reactor containing 1 l of modified PYG media at 37°C. (a) 1% glucose (b) 1% lactose -●- Cell Concentratim(Abs. 660 nm) ; -□- pH -▲- Degradation of Glucose ; -▽- Total H₂ Gas

2.1 미생물

Clostridium butyricum NCIB 9576, *Lactobacillus amylovorus* KCTC 35979(ATCC 33620), *Lactobacillus amylophilus* KCTC 3160, *Lactobacillus amylophilus* KCTC 3161, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 2182, *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33621, 하수처리장 메탄소화조 내의 슬러지에 존재하는 미생물 군집체와 이로부터 분리한 AI-9를 이용하였다.

2.2 배양방법

*Cl. butyricum*은 50 ml serum bottle에 40 ml modified PYG 액체 배지를 넣고, 균체를 660 nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 첨가하여 37 °C에서 배양하였다. 종배양에 사용된 serum bottle은 고무마개와 알루미늄 덮개로 밀폐하였고, 아르곤 가스를 흘려서 혐기 배양 조건을 만들었다. 종배양을 2~3회 반복하여 균의 활성화가 이루어지면,

50 ml serum bottle에 40 ml의 합성배지와 흡광도가 0.1이 되도록 종균을 첨가한 후, 37 °C에서 혐기 배양하였다. *Lactobacillus* 속 균주는 *Cl. butyricum*와 동일하게 배양하였으며, PYG 배지 대신에 MRS 배지(Difco Ltd)를 이용하였고, 아르곤 치환을 하지 않고, 고무마개와 알루미늄 덮개로 밀폐하였다. AI-9은 하수처리장 메탄소화조 내의 슬러지로부터 PYG 합성배지를 이용하여 anaerobic jar (Difco Ltd)에서 고체 배양한 후 1차 선별하고, 다시 혐기 액체배양에서 수소 생산성을 비교하여 선별하였다. 이외에도 1% glucose, 질소원(0.5% peptone과 0.5% ammonium sulfate) 및 buffering agent로 인산염이 첨가된 배지가 수소생산성을 검토하기 위해 사용하였다. pH는 serum bottle을 이용할 경우 초기 pH를 7.0으로 하고 배양중에는 조절하지 않았으며, jar fermentor 배양에서는 5.5-7.0으로 조절하였다.

2.3 분석

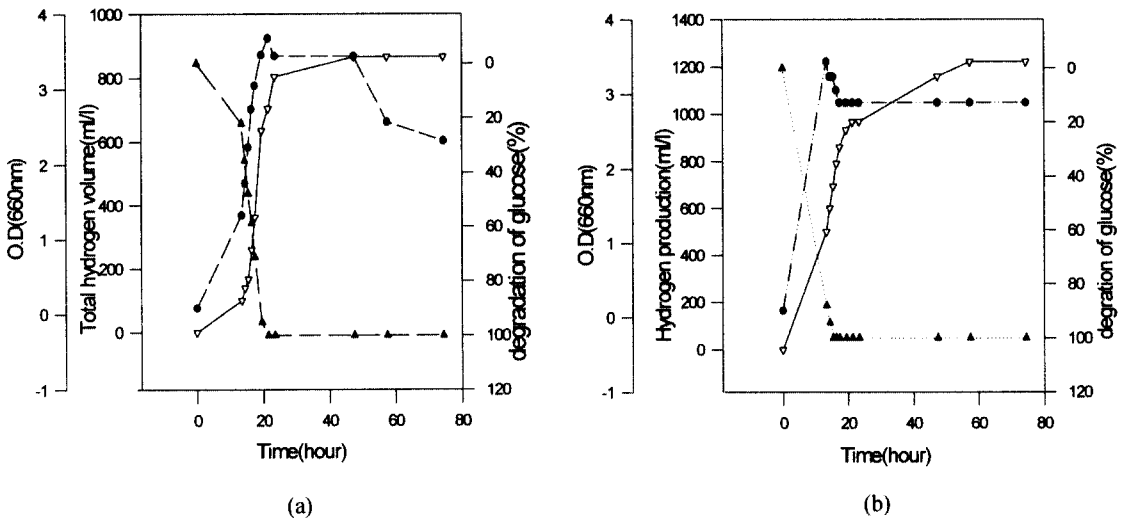


Fig. 2 Effect of pH control on the glucose consumption and hydrogen gas production during the anaerobic fermentation of *Clostridium butyricum* NCIB 9576. Cultures were anaerobically grown in 1.3 l reactor containing 1 l of modified PYG media containing 1% glucose as a carbon source and pH was controlled to 5.5 (a) and 6.5 (b).

-●-, Cell concentration Abs at 660 nm: -▲-, Degradation of glucose -▽-, Total H₂ gas

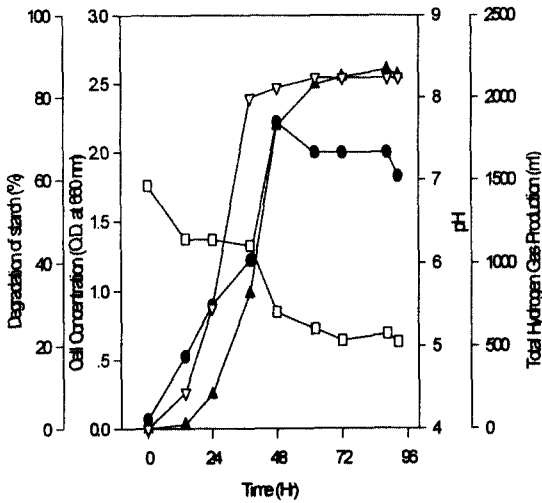


Fig. 3. Hydrogen production from PYG media containing 0.5% starch by *Clostridium butyricum* NCIB 9576. ●- Cell concentration Abs at 660 nm, □- pH ▲- Total H₂ gas, ▽- Starch.

수소는 배양기의 head space 가스를 Gas Chromatograph(Shimazu 14-B)로 분석하였다. 사용된 컬럼은 molecular sieve 5A (Supelco. Inc)이며, thermal conductivity detector (TCD)를 사용하였다. 유기산 분석은 Aminex HPX-87H, 300×7.8 mm (길이×내경)를 장착한 HPLC (Beckmann Gold System)를 사용하여 실온에서 분석하였으며, UV detector를 이용하여 파장 210 nm에서 측정하였다. 배양액의 환원당 정량은 dinitrosalicylic acid (DNS) 발색법을 이용하였고, 전분 농도는 5.5N HCl 0.2 ml과 2 ml 시료를 100°C 물에 30분간 가열시킨 후 2.2 ml Na₂CO₃를 첨가하여 중화시키고, DNS방법으로 정량하였다. 균체농도는 일정시간 간격으로 채취한 발효액을 UV-visible spectrophotometer (Shimazu UV-1601)로 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 실험결과 및 토론

*Clostridium butyricum*의 수소생산에 탄소원이

미치는 영향을 Fig.1에 나타내었다. *Clostridium butyricum* NCIB 9576은 혐기배양 24 시간 동안 1 % glucose로부터 총 630 ml 수소/day/ℓ - 배양액을 생성하였으며 최대 수소 생산율은 42 ml /시간/ℓ -배양액이었다. 첨가된 기질 중 glucose는 82 % 만이 이용되었다. 배양액 중에는 각종 유기산 및 유기 용매가 축적 되었는데 주로 acetate, butyrate 및 propionate와 유기용매로는 acetone, ethanol 등이었다. 배양 중 pH는 외부로부터 조절되지 않았으며, 배양 12~16시간 동안 초기 pH 6.8에서 4.2~4.5로 낮아졌고 배양 24시간 이후 균체 성장 및 수소 생산은 거의 정지하였다. 탄소원으로 첨가된 glucose는 배양액의 pH가 5 이상으로 유지될 때까지만 *C. butyricum* NCIB 9576에 의해 효과적으로 이용이 가능한 것으로 추정된다.

1% lactose를 탄소원으로 이용할 때, 이 균주는 약 1,700 ml 수소/ℓ-배양액을 생산하였으며, 최대 수소 생산율은 141 ml/시간/ℓ-배양액

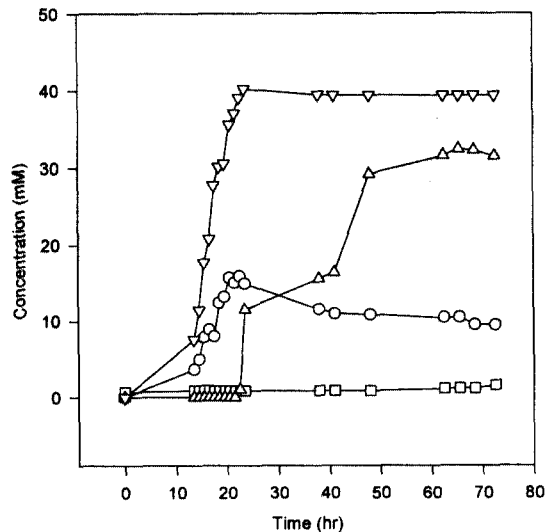


Fig. 4. Production of organic acids and ethanol by *clostridium butyricum* NCIB 9576 using 1% glucose as a carbon source. ▽-, ethanol; -△-, butyric acid; -○-, acetic acid; -□-, propionic acid.

이었다. 또한 배양액 pH는 glucose를 탄소원으로 이용할 때와는 달리 초기 pH 6.8로부터 발효가 진행됨에 따라 5.2-5.3 까지 감소하였으나, 더 이상 감소하지 않고 이후에도 5 이상으로 유지되었다. 이러한 배양액의 pH 5 이상의 유지는 대사 중의 수소 생산 및 유기산 생산 효소계를 안정화하여 기질의 분해와 아울러 수소생산을 유도하였다고 분석된다.

Fig. 2에 보인바와 같이 배양액의 pH를 5.5로 조절 하였을 경우, 약 18~20 시간후 첨가된 1% glucose 전량이 분해되었으며, 이때 발생된 수소의 총 양은 약 870~945 ml/day/l-배양액이었다. 이는 pH를 조절하지 않은 경우보다 약 38~50% 수소 생성량이 증가한 것이다. 또한 발효중 배양액을 pH 6.5으로 조절하였을 경우는 첨가된 glucose 100%가 분해되는데 약 14-15시간이 소비되었고, 배양 24시간 동안 수소는 약 940~1,000 ml/day/l-배양액 발생하였다. 또한 배양액의 pH 조절로 인하여 수소가스 발생은 48시간까지 계속적으로 증가하였으나, 증가량은 배양 24시간~48시간 사이 각각 62 ml 및 190 ml 이었다. 배양액을 pH 6.5로 조절하였을 경우 5.5로 조절하였을 때보다 약 6~8% 가량 높은 수소 생산을 보였으나, 실질 폐수를 생물학적 수소 생산 기질로 이용할 경우는 환경에 존재하는 메탄 박테리아를 비롯한 수소 소비 박테리아의 활성을 최소화하기 위해 pH 5.5로 조절하는 것이 바람직하다고 사료된다. 균체 증식량은 배양 15~17시간에 최대이었으며, 그후 수소생산 박테리아의 lysis가 현저하여 발효 60시간 경과후 약 17-23% 가량의 균체농도가 감소하였다. 이와 같은 균체 용해 현상은 발효산물에 의해서 발효말기에 일어날 수 있는 현상으로, 본 균주의 경우 잘 알려져 있지 않지만, pH 6.5로 유지할 때는 이와 같은 현상이 거의 발생하지 않았던 것으로 미루어 배양액의 pH에 영향을 주는 발효중 생성된 유기산의 영향으로 사료된다.

혐기 발효중 생성된 유기산은 배양액의 pH 강하에 영향을 줄뿐만 아니라, 직접적으로 세포

막의 pH 구배에 영향을 주어서 최종적으로 배양액 중의 생성되는 유기산 비율에도 영향을 준다. pH가 6.5에서 8로 증가할 때 총 유기산 양이 1.7배 증가하며, 또한 각종 유기산 생산 비율도 변화하여, 배양액 중에 acetate/butyrate의 비율이 pH가 낮아질수록 감소한다고 보고되었다(4). 이와같은 현상은 본 실험에서도 관찰되어 *C. butyricum* NCIB 9576은 starch를 기질로 이용할 때, glucose나 lactose의 경우보다 배양중 발효액의 pH가 높게 유지되었으며, 이때는 butyrate보다 acetate의 생성이 높았다(Fig. 3). 또한 1% glucose를 탄소원으로 사용하여, 배양액 pH 5.5~6.0로 조절한 경우 유기산 생성을 Fig. 4에 나타내었다. Acetic acid는 최대 16 mM이 배양 20~24시간에 측정되고, 이후 감소하여 48시간에는 10 mM 가량 생성되었다. Butyrate는 배양 초기 20 시간까지는 거의 생성되지 않았지만, 그후 계속 증가하여 배양 40 시

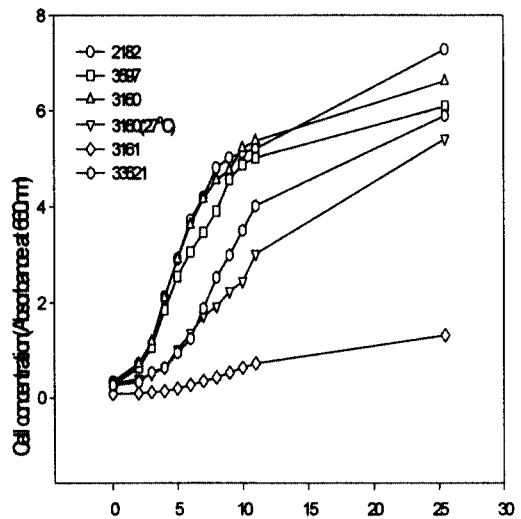


Fig. 5. Growth curves of lactic acid bacteria using MRS media

- 2182: *Lactobacillus acidophilus* KCTC 2182,
- 3160: *L. amylophilus* KCTC 3160
- 3161: *L. amylophilus* KCTC 3161
- 3597: *L. amylovorus* KCTC 3597(ATCC 33620)
- 33621: *L. amylovorus* ATCC 33621

Table 1. Lactic acid bacteria에 의한 유기산 생성

		2 % glucose						2 % starch					
		2182		3160		3597		2182		3160		3597	
		전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후
pH		5.95	3.45	5.97	3.54	5.89	3.54	5.98	3.87	5.98	3.98	5.87	3.95
Cell Conc.		0.35	7.00	0.30	7.38	0.29	6.84	0.34	5.98	0.31	5.48	0.30	5.12
유기산 (mM)	lactate	0	53	0	50	0	65	0	51	0	43	0	60
	acetate	0	50.41	0	52.67	0	50.22	0	22.14	0	28.60	0	44.40
	propionate	0	21.17	0	21.70	0	20.68	0	20.29	0	23.12	0	45.59
	butyrate	0	16.28	0	13.06	0	13.28	0	18.26	0	16.21	0	13.30
2182: <i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 2182, 3160: <i>L. amylophilus</i> KCTC 3160 3597: <i>L. amylovorus</i> KCTC 3597 (ATCC 33620)													

Table 2. *Chlamydomonas reinhardtii* 바이오매스로부터 각종 전처리 및 lactic acid 발효에 의한 유기산 생성

		A				B				C			
		1(%)		5(%)		1(%)		5(%)		1(%)		5(%)	
		전	후	전	후	전	후	전	후	전	후	전	후
pH		6.26	5.24	6.64	6.04	6.64	6.00	6.52	5.88	6.34	6.01	6.41	6.1
starch(%)		0.05	0.03	0.54	0.08	0.06	0.03	0.35	0.09	0.05	0.03	0.35	0.08
생성 유기산 (mM)	lactate	0	52.64	0	52.21	0	69.7	0	72.77	0	69.8	0	70.08
	acetate	0	133.0	0	132.98	0	114.65	0	132.87	0	125.2	0	133.55
	butyrate	0	126.9	0	91.66	0	54.76	0	66.67	0	80.2	0	97.68
A. glucose를 첨가하지 않은 MRS 배지 10 ml에 centrifuge한 algae 0.1 및 0.5 g wet wt. cells을 넣고 lactic acid bacteria seed 5% 접종 후 37°C 배양 B. glucose를 첨가하지 않은 MRS 배지 10 ml에 centrifuge한 algae 0.1 및 0.5 g wet wt. cells을 넣고, 1.0 N HCl이 되도록 첨가 후 121°C에서 20분간 autoclave한다. 처리 후 lactic bacteria를 접종하여 배양한다. glucose 제한 MRS 배지 10ml 에 5% seed 접종 후 37°C 배양 C. glucose를 첨가하지 않은 MRS 배지 10 ml에 centrifuge한 algae 0.1 및 0.5 g wet wt. cells을 넣고, 1시간 동안 냉동 후 해동시킨다. 해동된 균체에 5% lactic acid bacteria seed 접종 후 37°C 배양													

간까지 최대 생성속도를 보였고, 배양 64 시간 후 약 30 mM 가량 축적되었다. 여러 가지 유기산 생성량 및 종류 변화는 또한 수소생산량과 밀접한 관련이 있어서 포도당 한 분자가 acetate 또는 butyrate 어느 한쪽만으로 전환될 때의 반응에서는 각각 4 mol 또는 2 mol 의 수소가 생성된다. *Cl. butyricum*은 포도당으로부터 butyrate를 주요 대사산물로 축적하는 세균이며 Embden Meyerhoff 경로를 거쳐 수소, 이산화탄소, butyrate를 생성하며, 동시에 lactate, acetate, butanol, 에탄올도 생성할 수 있는 발효 경로를 갖는다. 위와 같은 대사 산물의 비는 배양조건에 따라 달라질 수 있으나 대사 과정에서 수소발생은 ferredoxin이 중재하는 NADH 산화반응에 의한 것으로 총괄적인 산화환원 전위상태가 결정된다. 즉, 혐기발효에 의한 수소생산은 2 mol acetic acid와 동시에 최대 4 mol 수소를 생산한다. 이는 포도당 1 mol로부터 생산할 수 있는 12 mol 수소 중 약 33%의 전환에 불과하지만, 이때 동시에 생성된 acetate는 광합성에 의한 수소생산 기질로서 적당한 광조건 하에서 광합성 박테리아에 의해 아래식과 같이 높은 효율의 수소 발생을 유도 할수 있다.

즉, 혐기 발효 및 이와 같은 유기산으로부터 광합성에 의한 수소발생은 이론적으로 1 mol 포도당로부터 최대 12 mol 수소가 발생하지만, 실질적으로 발효 중에 발생하는 pH 변화, 유기산 생성을 등은 수소생산 효율을 크게 좌우하고, 더욱이 제당, 식품 폐수를 이용할 경우 타 박테리아나 폐수 중에 존재하는 금속이온 및 질소원 종류 등이 수소생산에 영향을 준다. 따라서 기질로부터 수소 발생과 아울러 유기산의 축적을 최대화할 수 있는 발효 조건의 최적화는 더욱 연구가 요구된다.

Clostridium 속 세균은 절대 혐기 상태에서 환원당 뿐만 아니라 전분계 탄수화물 및 xylan, pectin, mannitol, sorbitol, glycerol, cellobiose, sucrose 등을 분해하여 수소로 전환시키는 다양한 기질 이용성을 갖고 있어서 바이오매스 자원

을 생물학적으로 전환시키는데 유용한 미생물이다.

여러 가지 lactic bacteria의 성장곡선을 Fig. 5에 나타내었다. *L. acidophilus* KCTC 2182, *L. amylophilus* KCTC 3160, *L. amylovorus* KCTC 3597은 실험조건 (37°C, 2% seed 첨가, 혐기 배양조건)에서 배양 2.5~7.5시간에 성장 대수기를 나타내었으며, 10시간 이후에는 pH 저하로 인하여 균체성장율이 낮아졌다. 균체 농도는 초기 0.2 (흡광도, 660nm)에서 최대 흡광도 5~6으로 성장하였으며, *L. amylophilus* KCTC 3161과 27°C에서 배양한 *L. amylophilus* KCTC 3160을 상대적으로 균체의 성장이 늦었다. 세 종류의 lactic bacteria의 glucose 및 starch를 이용시 pH와 유기산 생성을 관찰한 결과를 Table 1에 나타내었다. 배양초기에는 lactate가 주로 생산되었으나 시간이 경과함에 따라 acetate, propionate 및 butyrate가 생성되었다. 일반적으로 *L. amylophilus* 와 *L. amylovorus* 균주는 *L. acidophilus*와 는 달리 세포벽과 같은 고분자 다당류물질 분해력이 있어서 본 실험과 같이 *Chlamydomonas reinhardtii*가 생산하는 algae 바이오매스를 분해하여 유기산으로 전환할 수 있다. 산-열처리 또는 냉동-해동 전처리로 세포벽을 약화한 후 lactic bacteria로 발효할 경우 lactate, acetate 및 butyrate등의 각종 유기산이 생성되었다(Table 2). 본실험에 적용된 starch는 비교적 *L. acidophilus*에 의해서도 쉽게 lactic acid 및 acetic acid로 분해되었다.

4. 결 론

- 1) *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus acidophilus*, AI-9 균주는 혐기 발효에서 glucose, lactose, 및 starch를 이용하여 복합 유기산을 생산하였다.

- 2) *Clostridium butyricum* NCIB 9576은 1% glucose와 lactose로 부터 각각 초기 배양 24 시간 동안 950 및 1,700 ml 수소/ℓ-배양액을 생산하였으며, 배양액 중에 butyric acid, acetic acid, propionic acid 및 ethanol을 축적하였다.
- 3) *Clostridium butyricum* NCIB 9576은 유기산의 생성은 배양액의 초기 pH 6.8을 12~16시간 동안 4.2~4.5로 낮추고 배양 24시간 이후 균체 증식 및 수소생산은 거의 정지하였다.
- 4) *Clostridium butyricum* NCIB 9576은 배양 중 pH를 5.5로 조절하였을 경우, 배양 18~20 시간동안 기질 이용율은 100 %로 증가하였으며, 총수소 발생량도 pH를 조절하지 않았을 때와 비교하여 약 38~50 % 증가하였다.
- 5) *Clostridium butyricum* NCIB 9576은 starch와 glycerol로 부터 pH 조절 없이 유기산과 수소를 생산하였으며, 발효시간은 glucose와 비교하여 지연되었으며, glucose로 부터 이 균주는 ethanol, acetate, butyrate를 배양액 중에 주로 축적하였고, propionate는 거의 축적하지 않았지만, lactose, starch, glycerol을 기질로 이용할 때는 butyrate가 주로 축적되었다.
- 6) *L. amylophilus* KCTC 3160, *L. amylovorus* ATCC 33620 및 *L. amylovorus* ATCC 33621은 초기 pH 6.0으로 조절하여 37℃에서 혐기 배양 13-15시간 동안 glucose 및 starch를 lactate, acetate, butyrate로 분해하였으며, 초기 pH는 배양이 종료되었을 때 4.0이하로 저하되었다.
- 7) *L. amylovorus* ATCC 33620은 2 % soluble starch를 기질로 이용할 경우, 배양 중에 reducing sugar, lactic acid 및 acetic acid를 축적하였고, 혐기발효 중에 수소는 생성되지

않았다.

- 8) glucose나 starch 대신 미세조류 바이오매스를 기질로 하고, *L. amylovorus*를 이용한 혐기 발효에서는 미세조류를 전 처리한 경우가 처리를 하지 않은 경우보다 lactic acid의 생산이 높았다.
- 9) 분리된 혐기균주 AI-9는 통성혐기성 조건에서 starch, glycerol, glucose, lactose로 부터 수소 생산력이 BCS 보다 우수하며, formate와 acetate를 배양액 중에 축적하였다.

후 기

본 연구는 과학기술부 국책기술연구사업으로 연구된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. J. G. Van Andel, G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, and A. M. Breure : "Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture", Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 23, 1985, pp. 21-26.
2. M.. Heyndickx, P. De Vos, B. Thibau, P. Stevens, J. I. De Ley, : "Hydrogen Gas Production from Continuous Fermentation of Glucose in a Minimal Medium with *Clostridium butyricum*", System. Applied Microbiology, 1986, Vol. 8, pp. 239-244.
3. P. M. Crabbendam, O. M. Neijssel, and D. W. Tempest : "Metabolic and Energetic Aspects of the Growth of *Clostridium butyricum* on Glucose in Chemostat Culture", Archives of Microbiology, 1985, Vol. 142, pp. 375-382.

4. D. X. Zhang, and M. Cheryan : "Direct Fermentation of Starch to Lactic Acid by *Lactobacillus amylovorus*", Biotechnology Letters, Vol. 13, No. 10, 1991, pp. 733-738.
5. A. Ike, N. Toda, T. Murakawa, K. Hirata, and K. Miyamoto : in Biohydrogen, Zaborsky (Edi.) Plenum Press New York pp. 311-318.
6. H. Kawaguchi, K. Hashimoto, K. Hirata, and K. Miyamoto : "H₂ production from Algae Biomass by a Mixed Culture of *Rhodobium marinum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*", Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 91, No. 3, 2001, pp. 277-282.
7. M. Heyndickx, P. De Vos, B. Thibau, P. Stevens, J. I. De Ley, : "Effect of Various External Factors on the Fermentative Production of Hydrogen Gas from Glucose by *Clostridium butyricum* Strains in Batch Culture", System. Applied Microbiology, 1987, Vol. 9, pp. 163-168.