

고정화 *Zymomonas mobilis* 균체로부터 에탄올 생산

한면수* · 정동호

중앙대학교 산업대학 식품가공학과

Ethanol Production Using Alginate Immobilized Cells of *Zymomonas mobilis*

Han, Myun-Soo* and Dong-Hyo Chung

Dept. of Food Science & Technology, College of Industrial Science,
Chung-Ang University, Seoul 150-756, Korea

Abstract — The fermentation characteristics of ethanol production by the use of immobilized *Zymomonas mobilis* KCTC 1534 cells were investigated in terms of formation factors such as substrate and product concentration. In batch fermentation, the maximum values of specific ethanol productivity, specific substrate uptake rate, ethanol yield, and glucose conversion rate were 29.14 g/l·h, 60.24 g/l·h, 0.48 g/g, and 98.4%, respectively, with 17% glucose medium, and its ethanol productivity was 2.91 g/l·h in the case of 25 hour fermentation time. Repeated batch fermentation was possible for 30 days with 2.24~2.94 g/l·h ethanol productivity. In semicontinuous fermentation, the maximum ethanol productivity was shown to be 15.7 g/l·h at 0.36 h⁻¹ effective dilution rate with 17% glucose concentration. In this case, ethanol yield coefficient and glucose conversion rate were 0.39 g/g, 64.7%, respectively.

고정화 균체를 이용한 에탄올발효는 반응기내 균체 농도를 높이 유지하는 장점을 지녀 최근 많은 관심(1)을 갖게 되었다. 그러나 미생물반응의 공업적 응용에 있어 생체촉매의 연속적 이용을 위한 균체 고정화에 관하여서는 생산조건에 필요한 생리학적 변수의 시험이 요구되고 또한 해결되어야 할 많은 문제점이 남겨져 있어 연구 보고(2-5)가 많은데 비하여 실제적인 실용화는 별로 진행되지 않고 있으며 그 적용범위도 극히 제한되고 있는 실정이다(6, 7). 그러나 고정화 균체는 어느정도의 교반 상태에서도 공간적으로 서로 밀접한 접촉상태를 유지할 수 있으므로 발효기내에서 균체들간의 공생계를 파괴하지않고 적극적으로 교반될 수 있는 특성이 있어 유리 균체보다 더 오랜기간 동안 반응활성을 유지할 수 있어 반응수행에 유리한 점을 지니고 있다. 고정화 균체에 의한 발효를 행하는 경우 기본적으로 규명되어야 할 사항은

최적 온도, 최적 pH와 최적 영양원 등의 조성으로 유리 균체와의 차를 비교하여야 한다. 그리고 살아있는 세포로 인해 반응기 자체가 항상 비정류상태에 있으므로 안정된 공정의 작동이 매우 어려운 점에 주안을 두어야 한다. 또한 증식된 미생물을 고정화시키는 방법에 따라 기질의 물질전달이 전체 반응의 율속인자가 되므로서 반응기의 생산성에 저해 요인이 되는 수도 많다는 것을 고려하여야만 한다.

지금까지 에탄올발효는 주로 효모에 의존하여 왔다. 그러나 생산성을 높이는데는 한계점(8)이 있어 최근 효모 이외의 균으로 에탄올생산을 시도하고자 하고 있다. 효모 이외 에탄올을 생산하는 균주(9)로는 *Zymomonas mobilis*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium thermohydrosulfurium*, *Bacillus macerans*, *Erwinia amylovora*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Sarcina ventriculi*와 대장균 육종균주 등의 세균류를 들 수 있다. 그러나 이들 각 균주는 기질을 분해하여 에탄올과 탄산가스 기타 산 또는 아세톤을 생성하는

Key words: Ethanol fermentation, cell immobilization, *Zymomonas mobilis*

*Corresponding author

과정이 일정하지 않지만 현재 많은 연구가 이루어지고 있고 차후 그 연구 결과가 기대되는 에탄올 생성균으로는 *Zymomonas mobilis*를 들 수 있다.

따라서 본 연구에서는 *Zymomonas mobilis* 균체를 고정화조건이 용이하고 비교적 안정된 형태의 구형을 이루며 발효중 유출되는 균체량이 적은 sodium alginate에 고정화하여 에탄올을 생산하고자 하였고 이를 회분발효와 반연속발효에 적용시켜 조성인자의 영향에 대한 발효특성치를 규명한 일부의 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

미생물과 배양

본 연구의 공시균주는 한국과학기술연구원에서 분양받은 *Zymomonas mobilis* KCTC 1534를 사용하였다. 균주의 배양은 전보(10)에 준하였으며 원심으로 집균하여 살균된 생리식염수로 수회 세척시킨 균체를 고정화하였다.

Alginate 고정화

Zymomonas mobilis KCTC 1534 균주의 alginae 고정화는 전보(10)에 준하였다.

에탄올 발효

회분발효 : 에탄올 생산배지는 보존배지의 기질농도를 조절한 후 CaCl_2 를 0.3%로 하여 살균하였다. 이 경우는 기질과 CaCl_2 를 별도로 분리하여 살균한 후 혼합하였다. 회분발효는 실리콘 발포마개를 부착시킨 300 ml Erlenmeyer flask에 에탄올 생산배지(이하 생산배지) 90 ml와 고정화 균체 10 ml를 넣고 작용량 100 ml가 되게하여 왕복진탕배양기(100 strokes/min)에서 발효시켰다. 기질의 종류, 농도, 온도, pH와 발효시간 등은 제어하고자 하는 조건으로 조절하여 실험하였다.

반연속발효 : 반연속발효를 실험하기 위하여 각각의 300 ml Erlenmeyer flask에 7~17%(70~170 g/l) glucose 농도의 각 생산배지 90 ml와 고정화 균체 10 ml를 넣어 작용량 100 ml로 하여 33°C에서 회분발효를 하였다. 20시간 후 발효된 각 기질농도의 발효기에 기질농도가 동일한 생산배지로 매 시간마다 작용량의 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4의 비로 각각 교환하면서 계속 발효시키고 각 교환용량비에서 시간에 따른 에탄올함량, 잔당량과 유출균체량의 변화를 조사하였다.

반응상수의 계산 : 에탄올발효에서 고찰한 반응상수는 다음과 같다.

에탄올생산성(ethanol productivity, P_E , g/l·h)은 단위시간당 생산할 수 있는 에탄올양으로 식 (1)에 의하여 계산하였다.

$$P_E = \frac{P}{\Delta t} \quad (1)$$

단, Δt : 발효시간(h), P : 에탄올함량(g/l)을 나타낸다.

에탄올수율(theoretical ethanol yield, η , %)은 이론적 에탄올생산량에 대한 실제 에탄올생산량의 비로 식 (2)에 의하여 계산하였다.

$$\eta = \frac{P}{E} \times 100(\%) \quad (2)$$

단, E : 이론적 에탄올생산량(g/l), P : 실제 에탄올생산량(g/l)을 나타낸다.

에탄올생산율(yield of ethanol production, Y , g/g)은 에탄올생산량에 대한 주입기질량의 비로 식 (3)에 의하여 계산하였다.

$$Y = \frac{P}{G} \quad (3)$$

단, G : 주입기질량(g/l)을 나타낸다.

비기질 소모속도(specific substrate uptake rate, q_s , g/l·h)는 대수기에서 고정화 균체가 단위시간당 소모할 수 있는 기질량으로 식 (4)에 의하여 계산하였다.

$$q_s = \frac{1}{X} \times \frac{dS}{dt} \quad (4)$$

단, X : 고정화 균체량(l), dS : 기질소모량(g/l), dt : 발효시간(h)을 나타낸다.

비에탄올 생산속도(specific ethanol productivity, q_p , g/l·h)은 대수기에서 고정화 균체가 단위시간당 생산할 수 있는 에탄올양으로 식 (5)에 의하여 계산하였다.

$$q_p = \frac{1}{X} \times \frac{dP}{dt} \quad (5)$$

단, dP : 에탄올생산량(g/l)을 나타낸다.

기질전환율(substrate conversion rate, %C, %)은 에탄올발효에 사용된 기질량과 주입한 기질량의 비로

식 (6)에 의하여 계산하였다.

$$\%C = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100(\%) \quad (6)$$

단, S_0 : 최초 주입기질량(g/l), S : 발효종료후 기질량(g/l)을 나타 낸다.

에탄올 수율계수(ethanol yield coefficient, $Y_{p/s}$, g/g)는 소모된 기질에 대한 생성된 에탄올량의 비로 식 (7)에 의하여 계산하였다.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P - P_0)}{(S - S_0)} = \frac{\text{생성된 에탄올량(g)}}{\text{소모된 기질량(g)}} \\ = \frac{q_p}{q_s} \quad (7)$$

비증식속도(specific growth rate, μ_n , h^{-1})는 대수기에서 발효시간에 대한 균체량의 변화로 식 (8)에 의하여 계산하였다.

$$\mu_n = \ln \frac{X_n}{X_{n_0}} \times \frac{1}{t} \quad (8)$$

단, X_{n_0} : 최초 균체량(g), X_n : 일정시간 후 증가된 균체량(g)을 나타낸다.

균체수율(cell yield, $Y_{x/s}$, g/g)은 소모된 기질량에 대한 생성된 균체량의 비로 식 (9)에 의하여 계산하였다.

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (9)$$

단, ΔX : 균체생성량(g/l), ΔS : 기질소모량(g/l)을 나타낸다.

총괄 에탄올생산성(overall ethanol productivity, Q , g/l·h)은 회분발효에서 최대 에탄올농도와 소요된 시간의 비로 식 (10)에 의하여 계산하였다.

$$Q = \frac{P_{max}}{t} \quad (10)$$

단, P_{max} : 에탄올 최대생성량(g/l), t : 발효시간(h)을 나타낸다.

분석

균체량: 고정화 균체와 유출균체의 균체량은 전보(10)에 준하여 흡광도와 건조균체량 사이의 표준농도로부터 구하였다. 생균수는 발효액을 일정량 희석

하여 보존배지에 도말평판하여 30°C에서 40시간 배양시킨 후 생성된 집락수로 산출하였다.

포도당: 포도당은 발효액 1 ml를 원심침전시켜 얻은 상징액에서 DNS법으로 정량(11)하였다.

에탄올: 에탄올은 발효액 1 ml에서 원심침전시켜 얻은 상징액을 일정 배수로 희석한 후 isopropanol을 표준으로 첨가하여 gas chromatography를 사용하여 분석(12)하였다.

결과 및 고찰

회분발효에 의한 glucose로부터 에탄올생산

Zymomonas mobilis KCTC 1534 균체를 alginate에 고정화시켜 에탄올생산의 특성을 생산배지의 glucose 농도를 변수로 하여 33°C에서 회분발효로 실험하였다.

초기 기질농도의 영향: 생산배지의 glucose 초기 농도를 7~25%(70~250 g/l)로 조정하여 50시간 발효시킨 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 초기 glucose 농도 7%와 10%는 20시간, 13%와 17%는 25시간, 20%와 25%는 약 40~50시간에 발효가 종료되었다. 그리고 20%와 25%에서는 초기발효가 다른 농도에서 약 5~10시간인 것과 달리 약 20시간이 경과한 후 시작되었다. 그 결과 고정화 효모를 이용한 에탄올생산(13, 14)보다 짧은 발효 종료시간과 고농도의 기질에서 에탄올을 생산할 수 있었다. Fig. 1에서 반응상수를 계산하여 Table 1에 나타내었다.

유출균체의 비증식속도는 7%와 10%에서 0.3 h^{-1} 로 최대값을 나타내었다. 그러므로 glucose의 초기 농도가 높아지면 비증식속도는 감소되며 최대값에 도달하는 시간과 정지기에 도달하는 시간도 지연되어 13% 이상에서는 균체의 유출이 기질저해의 영향을 받게 된다. 비에탄올 생산속도, 비기질 소모속도, 에탄올생산율과 에탄올생산성은 초기 glucose 농도가 높아짐에 따라 증가되어 17%에서 각각 29.14 g/l·h, 60.24 g/l·h, 0.48 g/g, 2.91 g/l·h로 최대값을 나타내었고 20%부터는 감소되었다. 에탄올 수율계수는 glucose 농도 13~25%까지 0.48~0.49g/g로서 7%와 10%의 결과보다 높았다. 기질전환율은 7~20% 농도에서는 97% 이상이었으나 25% 농도는 73%로 감소되었다. 총괄 에탄올생산성은 13%까지는 증가되었으며 17%부터는 감소되었다.

본 *Zymomonas mobilis* alginate 고정화 균체는 33°C에서 약 10시간 유도기를 거친 후 활발한 발효가 일어나기 시작하여 48시간 후에는 완전히 종료되었

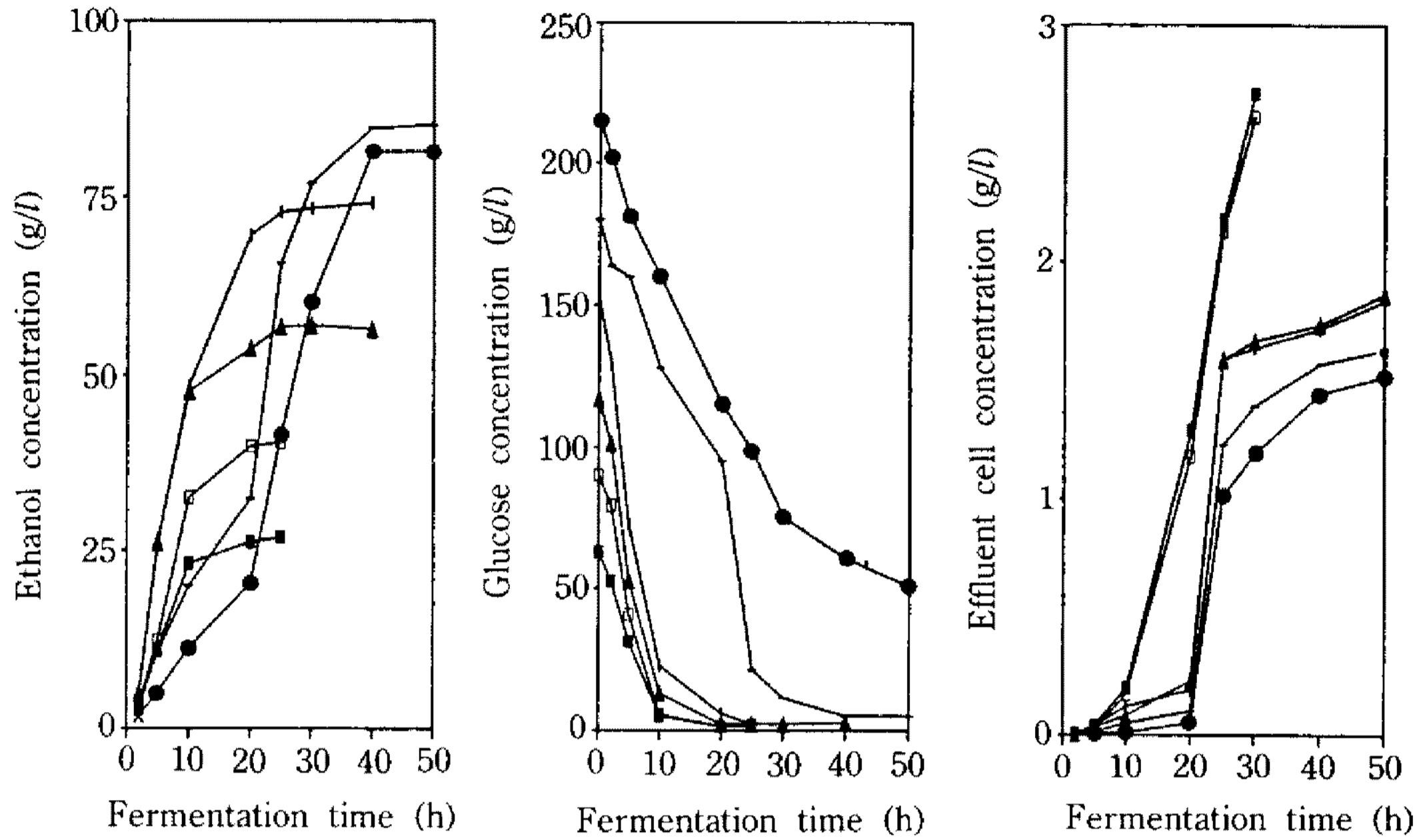


Fig. 1. Batch fermentation with immobilized *Zymomonas mobilis* cells.

—■—: 7% glucose, —□—: 10% glucose, —▲—: 13% glucose, —|— 17% glucose, — — —: 20% glucose, —●—: 25% glucose

Table 1. The effect of initial glucose concentration on the ethanol production with immobilized *Zymomonas mobilis* cells

Initial glucose concentration (%)	Parameters								
	μ_n (h^{-1})	q_p ($g/l \cdot h$)	q_s ($g/l \cdot h$)	Y (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	P_E ($g/l \cdot h$)	%C (%)	Q ($g/l \cdot h$)	T (h)
7	0.30	13.09	30.69	0.42	0.43	1.30	97.4	1.07	20
10	0.30	19.89	44.21	0.44	0.45	1.99	98.3	1.62	20
13	0.23	22.64	45.82	0.48	0.49	2.22	97.9	1.89	25
17	0.23	29.14	60.24	0.48	0.48	2.91	98.4	1.85	25
20	0.16	21.18	43.72	0.47	0.48	2.12	97.1	1.70	40
25	0.14	20.32	41.17	0.36	0.49	2.03	73.2	1.65	40

T: time for calculated

는데 이 결과는 같은 조건의 *Zymomonas*속 균체의 보고(15)와 일치되고 있다. Rogers 등(16)에 의하면 *Zymomonas mobilis* ZM4 균체는 발효시작 약 20시간에서 에탄올수율 0.48~0.49g/g의 결과를 얻었고 최대 비증식속도는 glucose 10%에서 $0.35 h^{-1}$, 30%에서 $0.13 h^{-1}$ 으로 저하되었다고 보고하였다. 또한 Margaritis 등(17)은 glucose가 10%에서 25%로 높아짐에 따라 비증식속도는 $0.21 h^{-1}$ 에서 $0.13 h^{-1}$ 으로 감소되었고 에탄올 수율계수는 20% 농도까지는 0.496 g/g으로 증가되었으나 25% 농도에서는 감소되었다고 보고하였으며 에탄올수율은 20% 농도에서 97.2%로 가장 높았다고 보고하였다. Laudrin-Seiller 등(18)이

5~19% glucose로 실험한 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 균체는 비증식속도가 $0.36 h^{-1}$ 에서 $0.26 h^{-1}$ 로 저하되었다고 보고하였다. 따라서 *Zymomonas mobilis*의 증식은 glucose 농도 20% 이상에서 강한 저해를 받아 비증식속도와 균체수율이 떨어지게 된다(19)는 것을 입증하였다.

초기 glucose 농도의 변화에 따른 비에탄올 생산 속도, 유출균체의 비증식속도와 균체수율간의 상관성을 알아본 바 Fig. 2와 같이 glucose 농도가 높아짐에 따라 비증식속도와 균체수율은 감소되지만 비에탄올 생산속도는 17% 농도에서 최대값을 보여주었다. 이러한 결과는 Torres와 Baratti(19)의 실험 결과에서도

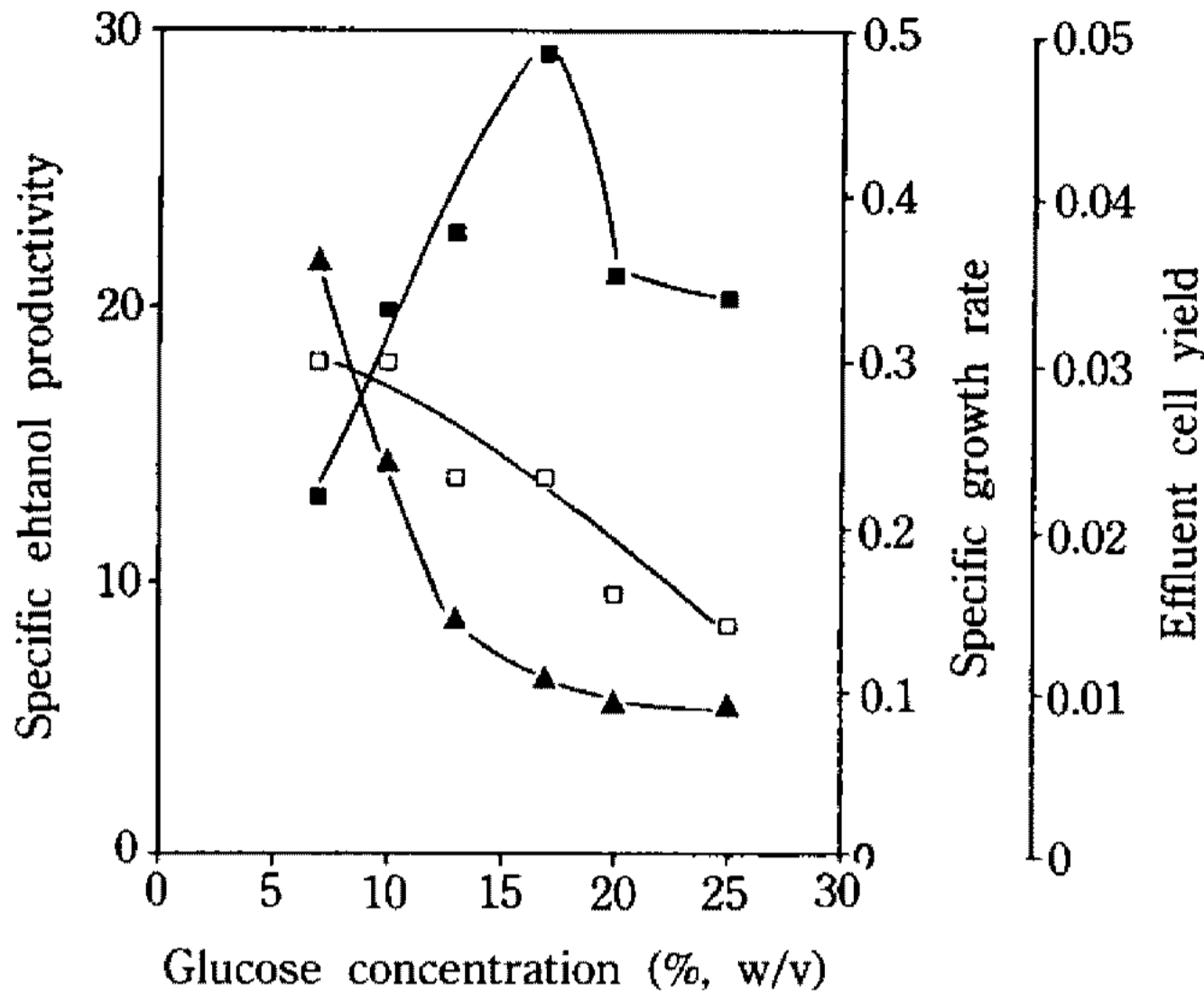


Fig. 2. Changes in kinetic parameters such as specific ethanol productivity, specific growth rate and effluent cell yield with initial glucose concentration.
 -■-: specific ethanol productivity (g/l·h), -□-: specific growth rate (h⁻¹), -▲-: effluent cell yield (g/g)

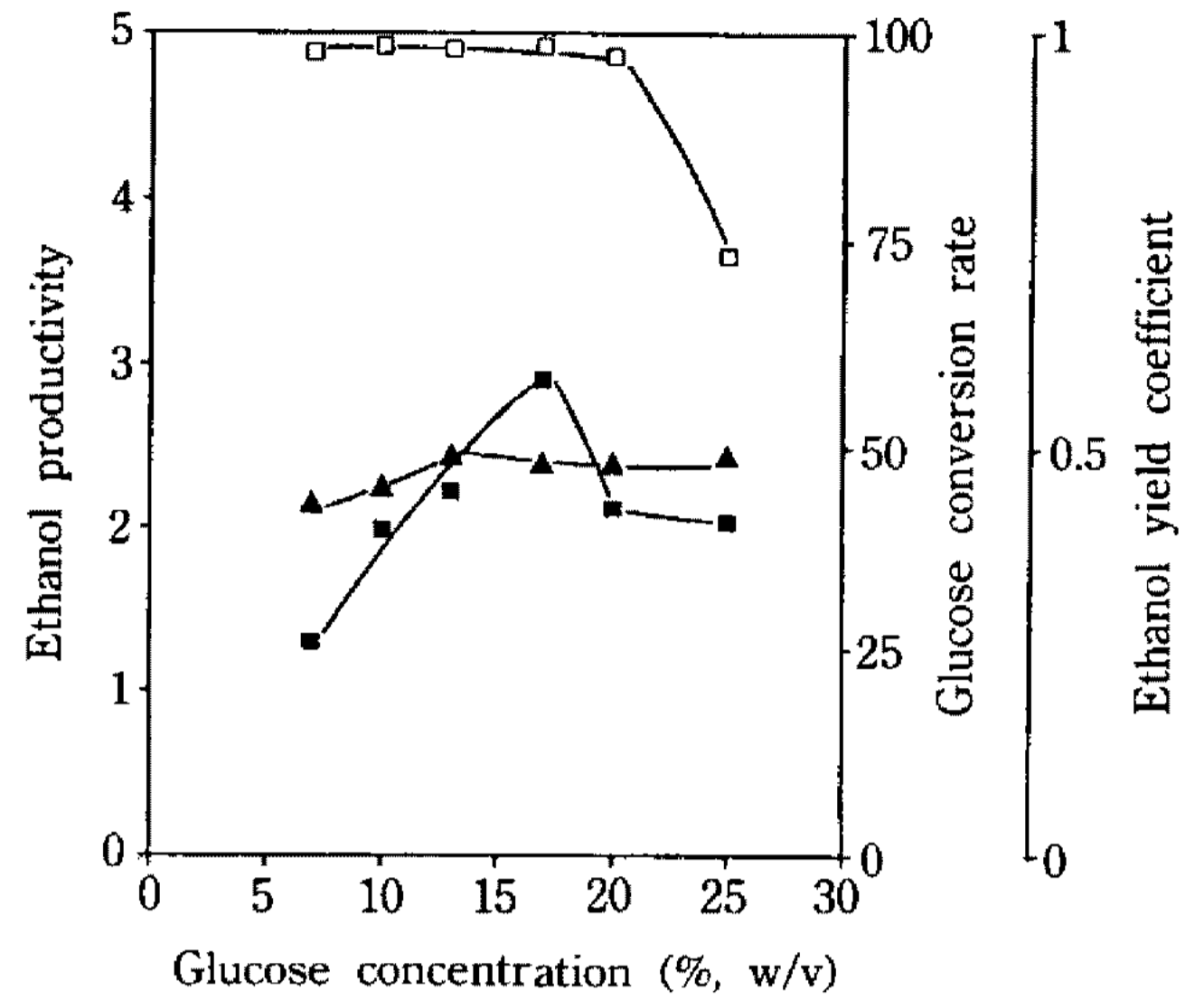


Fig. 3. Changes in kinetic parameters such as ethanol productivity, glucose conversion rate and ethanol yield coefficient with initial glucose concentration.
 -■-: ethanol productivity (g/l·h), -□-: glucose conversion rate (%), -▲-: ethanol yield coefficient (g/g)

보고된 바 있어 균체의 비증식속도가 빠르다고 비에탄올 생산속도가 높아지는 것이 아님을 나타내고 있다.

기질 농도에 따른 에탄올생산성, 기질전환율과 에탄올 수율계수의 상관성을 나타낸 Fig. 3에서 에탄올 생산성은 17% glucose 농도에서 최대이었고 기질전환율은 7~17% 농도에서 약 98%이었으나 20% 농도부터는 저하되어 25% 농도에서는 약 73%까지 감소되었다. 그리고 에탄올 수율계수는 13% 농도부터는 일정한 값을 유지하고 있어 고정화 균체를 이용한 회분발효에서는 기질의 농도가 최대의 생산성을 높이는 것이라고 여긴다.

반복발효에 의한 에탄올생산: 생산배지의 초기 기질농도를 13% glucose로 하여 24시간마다 신선한 생산배지로 교환시키면서 회분발효시킨 바 Fig. 4와 같이 30회(720시간) 이상 반복발효를 실행할 수 있었고, 생산배지의 교환시간은 20시간 내지 24시간 정도면 무난하였다.

유사한 예로 Margaritis 등(17)은 효모 *Debaryomyces polymorphus*를 고정화시켜 11회까지 반복발효시킬 수 있었으며 매 반복시 에탄올수율은 약 95%를 유지할 수 있었다고 하였다. 그리고 Nishizawa 등(20)은 hollow fiber에 고정화시킨 효모로 약 15일간 반복발효가 가능하였다고 보고하였다.

Fig. 4로부터 계산된 반복발효의 각 반응상수는 Ta-

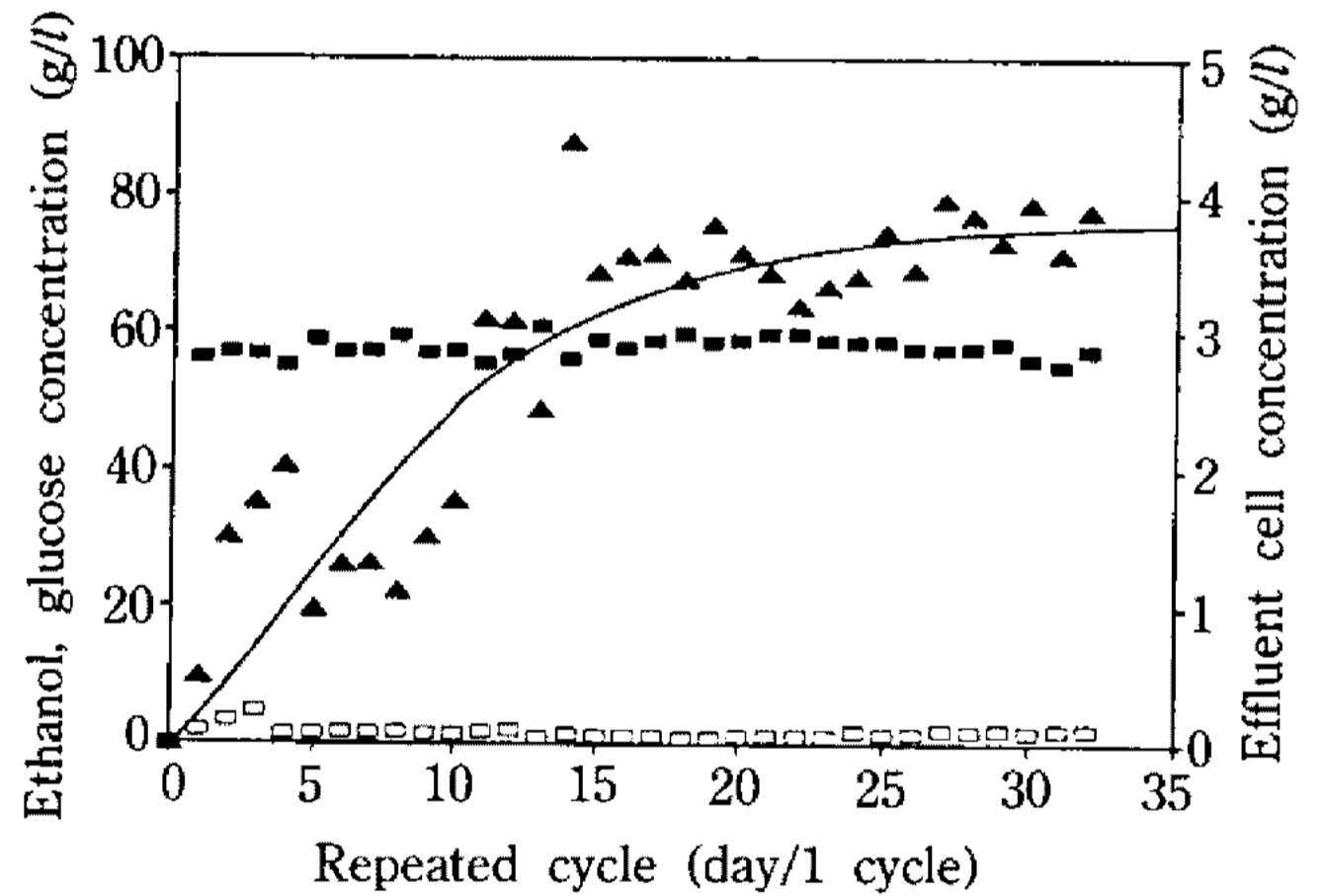


Fig. 4. Repeated batch fermentation with immobilized cells of *Zymomonas mobilis*.
 -■-: ethanol, -□-: glucose, -▲-: cell

ble 2와 같이 비에탄올 생산속도, 비기질 소모속도, 에탄올생성율, 에탄올 수율계수, 기질전환율, 에탄올 생산성과 에탄올수율 등이 반복시마다 일정한 값을 유지하고 있었다. 그러나 유출균체량의 경우 비증식속도는 10회까지 0.20 h⁻¹을 유지하였고, 20회에는 0.25 h⁻¹, 30회에 이르러서는 0.37 h⁻¹로 그 양이 계속 증가되었으며 30회 이후에는 젤이 붕괴됨과 동시에 표면에 균체들이 뭉쳐있는 것을 발견할 수 있었다. 반복횟수가 계속됨에 따라 유출되는 균체량이 증가되는 것은 고정화 균체의 재사용으로 젤이 손상되기 때문인 것으로 사료된다. 이 실험결과는 Baratti 등

Table 2. Kinetic parameters for repeated batch fermentations with 13% glucose

Cycles (h)	Parameters								
	μ_n (h ⁻¹)	q_b (g/l·h)	q_s (g/l·h)	Y (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	%C (%)	P_E (g/l·h)	η (%)	
1(24)	0.18	23.36	47.98	0.48	0.49	98.4	2.24	94.0	
2(24)	0.23	23.77	47.32	0.49	0.50	97.1	2.28	95.6	
3(24)	0.24	23.72	47.5	0.49	0.51	95.9	2.28	95.4	
4(24)	0.25	22.95	48.49	0.48	0.47	99.5	2.29	92.2	
5(24)	0.22	24.60	48.46	0.50	0.51	99.4	2.46	98.9	
6(24)	0.23	23.76	48.05	0.49	0.49	98.5	2.38	95.1	
7(24)	0.23	23.82	48.12	0.50	0.49	98.7	2.38	95.6	
8(24)	0.21	24.78	48.08	0.51	0.51	98.5	2.48	99.4	
9(24)	0.21	23.73	48.09	0.49	0.49	98.7	2.37	95.3	
10(20)	0.22	23.82	48.58	0.49	0.49	99.6	2.38	95.8	
15(24)	0.25	24.79	48.48	0.50	0.51	99.1	2.46	98.9	
20(24)	0.25	24.42	48.30	0.50	0.51	99.0	2.44	98.3	
25(24)	0.32	24.51	58.31	0.50	0.42	99.6	2.94	98.6	
30(24)	0.37	24.34	56.13	0.49	0.43	99.4	2.92	91.8	

(21)이 에탄올생산에 κ -carrageenan 고정화 균체를 사용한 결과와 비슷하였다.

반연속발효

반연속발효 특성 : 고정화시킨 *Zymomonas mobilis* 균체를 사용하여 반연속배양에서 에탄올발효를 실행하여 유효 희석속도와 기질농도의 변수로 에탄올발효 특성을 규명하였다.

반연속발효에서 고정화 균체로부터 유출되는 균체의 비증식속도는 정류상태에서 식 (11)에 의하여 계산하였다.

$$\mu_n = \frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt} \tag{11}$$

단, x : 유출균체량(g/l)을 나타낸다.

유효 희석속도(Effective dilution rate, De , h⁻¹)는 비증식속도로부터 산출된 식 (12)에 의하여 구하였다.

$$\mu_n = De = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{1}{(1-R)} \tag{12}$$

교환용량비(Replacement volume ratio, R, h⁻¹)는 전체 발효용량과 교환시키는 배지량의 비를 의미한다.

초기 glucose 농도 10%에서 회분발효 종료기인 20시간 후부터 시작된 반연속발효과정을 Fig. 5에 나타내었다. 총 발효시간인 15시간 동안 에탄올, glucose와

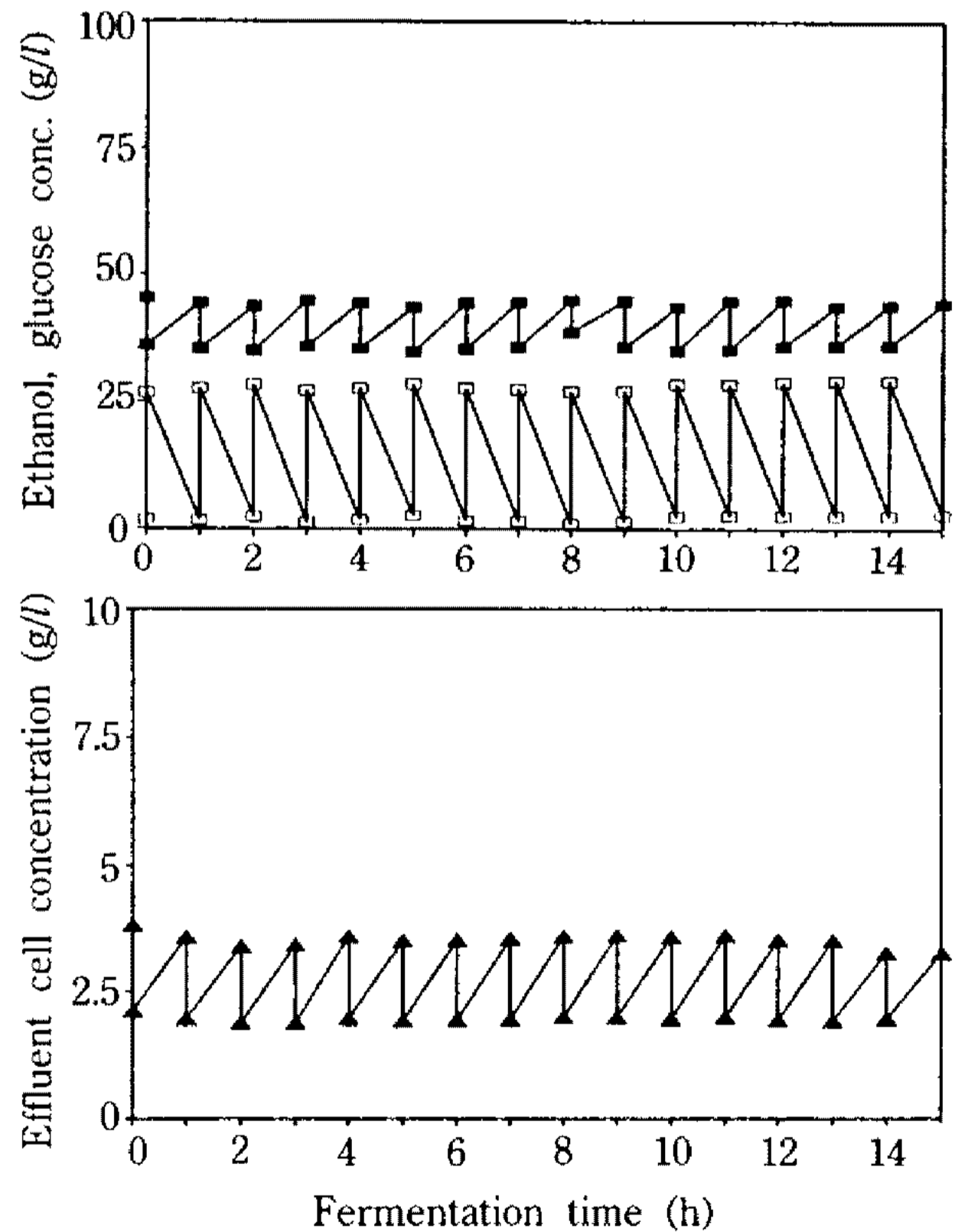


Fig. 5. Semicontinuous fermentation with immobilized cells of *Zymomonas mobilis* using 10% glucose.

—■—: ethanol, —□—: glucose, —▲—: cell

유출균체량이 정류상태를 유지하고 있었다. 이러한 결과는 Rogers 등(22)의 *Zymomonas mobilis* 균체를 사용한 연구와 Hur 등(23)의 효모 *Kluyveromyces*

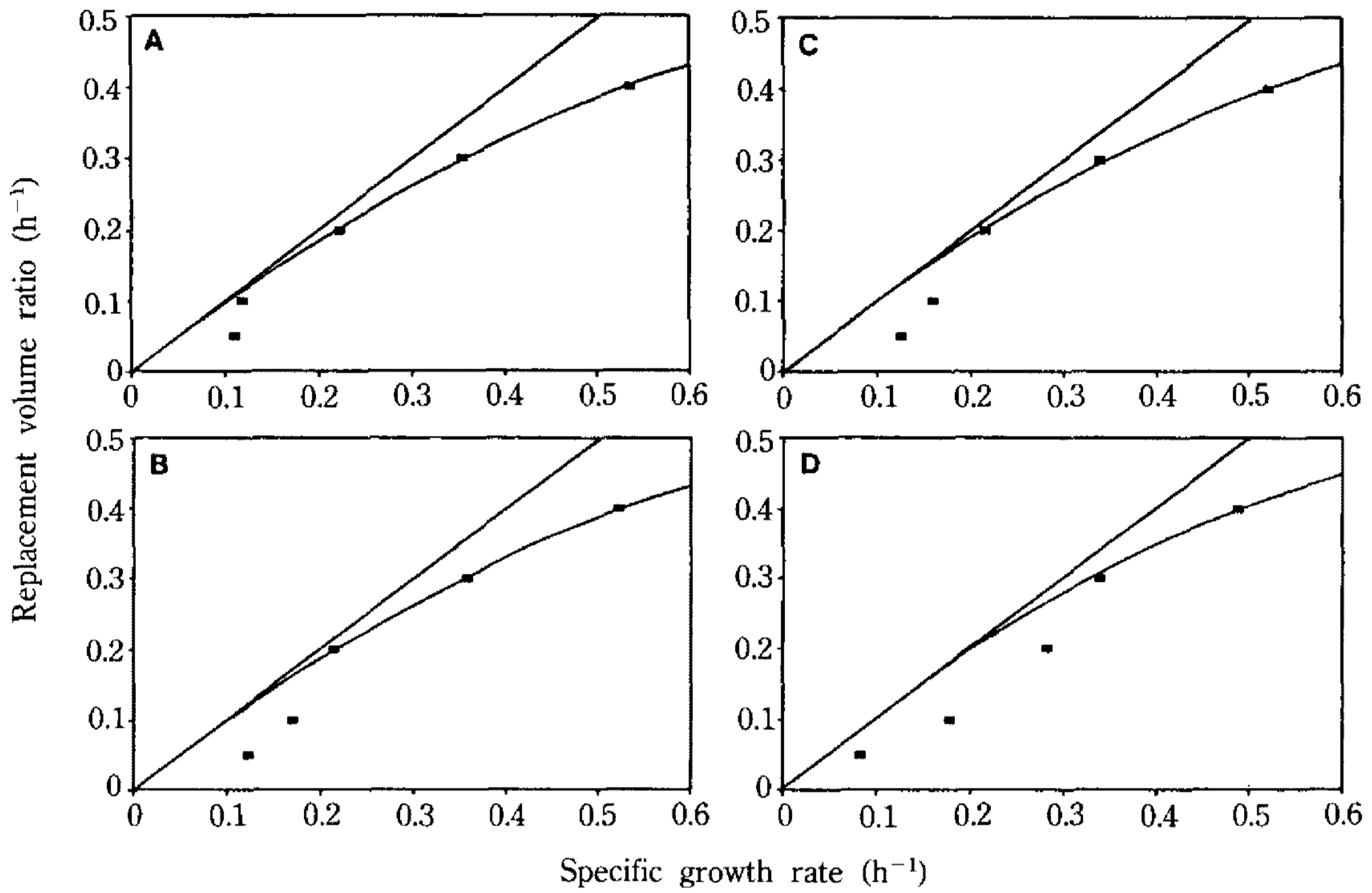


Fig. 6. Functional relationship between specific growth rate and replacement volume ratio.
 A: 7% glucose, B: 10% glucose, C: 13% glucose, D: 17% glucose

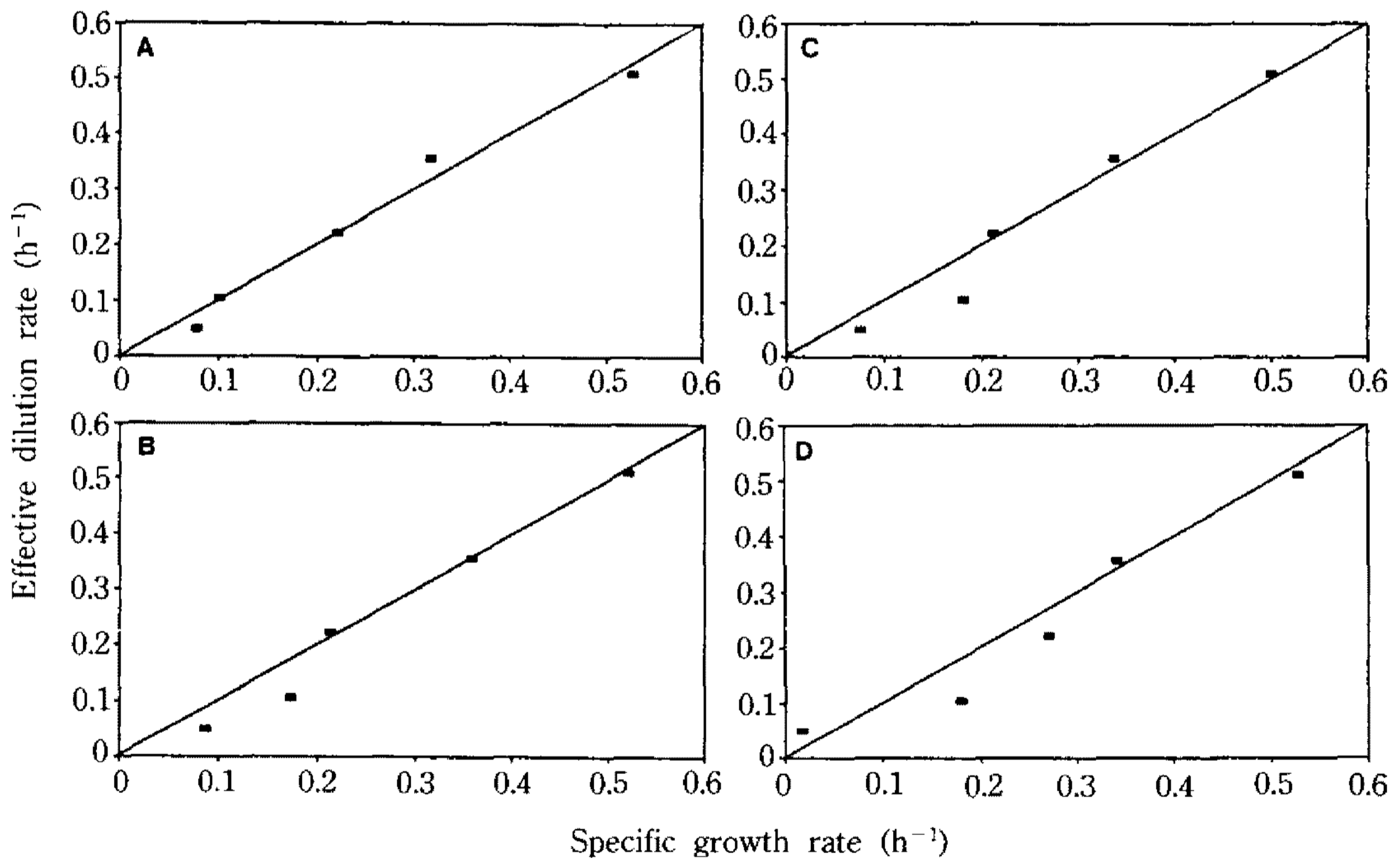


Fig. 7. Functional relationship between specific growth rate and effective dilution rate.
 A: 7% glucose, B: 10% glucose, C: 13% glucose, D: 17% glucose

*fragilis*에 의한 에탄올생산에서 보고한 바 있다.

반연속발효에서 유입시키는 glucose 농도에 따른 교환용량비와 비증식속도의 관계를 Fig. 6에 나타내었다. 각 glucose 농도에서 공히 교환용량비가 비증

식속도보다 크게 나타나고 있어 교환용량비를 반연속발효의 희석속도로 이용할 수 없었다. 그러므로 유효 희석속도에 따른 비증식속도의 변화를 알아보기 위하여 비증식속도와 유효 희석속도의 관계를 7~17

Table 3. The effect of initial glucose concentration on the semicontinuous ethanol production using immobilized cells of *Zymomonas mobilis*

Glucose conc. (%)	Parameters								
	De (h ⁻¹)	P (g/l)	q _p (g/l·h)	q _s (g/l·h)	Y _{p/s} (g/g)	Y (g/g)	%C (%)	P _E (g/l·h)	T (h)
7	0.05	33.76	16.9	34.6	0.49	0.48	98.6	1.69	10
	0.11	27.93	30.7	75.9	0.40	0.40	98.5	3.07	10
	0.22	27.77	61.1	149.9	0.41	0.40	97.4	6.11	10
	0.36	25.13	90.5	237.2	0.38	0.36	94.1	9.05	7
	0.51	24.42	124.5	331.5	0.38	0.34	92.8	12.45	7
10	0.05	41.02	20.5	49.4	0.42	0.41	98.8	2.05	10
	0.11	41.1	45.2	107.2	0.42	0.41	97.5	4.52	10
	0.22	37.08	81.6	213.9	0.38	0.37	97.2	8.16	10
	0.36	32.9	118.4	320.6	0.37	0.33	89.1	11.84	7
	0.51	29.32	149.5	409.8	0.36	0.29	80.4	14.95	7
13	0.05	53.88	26.9	64.2	0.42	0.41	98.6	2.69	10
	0.11	52.71	57.9	138.1	0.42	0.41	96.5	5.8	10
	0.22	46.84	103.0	264.6	0.39	0.36	92.5	10.3	10
	0.36	35.34	127.2	393.8	0.32	0.27	84.2	12.72	7
	0.51	30.32	154.6	460.6	0.33	0.23	69.5	15.46	7
17	0.05	64.77	32.4	83.5	0.39	0.38	98.2	3.24	10
	0.11	60.51	66.6	160.6	0.41	0.36	85.8	6.66	10
	0.22	49.51	108.9	257.8	0.42	0.29	68.9	10.89	10
	0.36	43.61	156.9	396.0	0.39	0.26	64.7	15.70	7
	0.51	29.82	152.0	491.6	0.31	0.18	56.7	15.21	7

T: time for calculated

% glucose 농도까지 조사하여 Fig. 7에 나타내었다. 유입기질의 glucose 농도에 상관없이 유효 회석속도와 비증식속도간에 1 : 1의 정비례관계가 성립되므로 반연속발효시 기질 교환을 1시간으로 할 경우, 유효 회석속도를 회석속도로 이용할 수있었다.

반연속발효에 의한 에탄올 생산: 반연속발효에서 고정화 *Zymomonas mobilis* 균체의 에탄올생성력을 기질 농도와 유효 회석속도에서 반응상수로 계산하여 Table 3에 나타내었다.

기질의 각 농도에서 비에탄올 생산속도와 비기질 소모속도는 유효 회석속도를 증가시킴에 따라 계속 증가되었으며 에탄올 수율계수와 에탄올생산율은 유효 회석속도가 증가됨에 따라 감소되었다. 그리고 기질 전환율은 7% glucose에서 유효 회석속도 0.05 h⁻¹일 때 98.6%로 가장 높았으며 17% glucose에서 유효 회석속도 0.51 h⁻¹인 경우 48.9%로 가장 낮았다. 한편 본 실험조건에서 최대 에탄올생산성은 17% glu-

cose, 유효 회석속도 0.36⁻¹에서 15.70 g/l·h이었다.

요 약

Zymomonas mobilis KCTC 1534 균체를 alginate에 고정화시킨 후 기질농도의 상관성으로 회분발효와 반연속발효에서 에탄올 생산을 시도하였다. 회분발효에서 17% glucose 농도로 발효시간 25시간에서 최대 에탄올 생산성 2.91 g/l·h를 얻었고 이경우 비에탄올 생산속도 29.14 g/l·h, 비기질 소모속도 60.24 g/l·h, 에탄올 수율 계수 0.48 g/g, 기질전환율 98.4%이었다. 생산배지의 전량 교환에 변수를 준 반복발효는 교환 시간 20~24 시간에서 약 30일 동안 에탄올생산성 2.24~2.94 g/l·h, 에탄올 수율계수 0.42~0.51 g/g, 기질전환율 95.9~99.6%로 실행할 수 있었다. 반연속 발효의 경우 생산 배지의 교환 간격을 회석속도로 이용한 유효 회석속도 0.36 h⁻¹에서 17% glucose 농

도로 최대 에탄올생산성 15.7 g/l·h를 얻었고 이경우 비에탄올 생산속도 156.9 g/l·h, 비기질 소모속도 396.0 g/l·h, 에탄올 수율계수 0.39, 기질전환율 64.7%이었다.

참고문헌

1. Busche. 1991. Abstract, *Industrial Bioprocessing (Bioprocessing Technology)*, 13: 5.
2. Hattori, T. and J. Furusaka. 1959. Chemical activity of *E. coli* cells adsorbed on a resin. *Biochem. Biophys. ACTA*, 31: 581-582.
3. Klein, J. and K.D. Vorlop, 1985. Immobilization techniques-cell, Pp. 204-212, In Murray Moo-Young(ed.) *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2, Pergamon press, Oxford.
4. Rhu, B.H. and K.D. Nam. 1987. Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeast cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 15: 248-252.
5. Kuu, W.Y., and J.A. Polack. 1983. Improving immobilized biocatalysts by gel phase polymerization. *Biotech. Bioeng.* 25: 1995-2006.
6. Navarro A.R., M.C. Rubio, and D.A.S. Callieri. 1983. Production of ethanol by yeast immobilized in pectin. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 148-151.
7. Dainty, A.L., K.H. Goulding, P.K. Robinson, I. Simpkins and M.D. Trevan. 1986. Stability of alginate immobilized algal cells. *Biotech. Bioeng.* 28: 210-216.
8. Jones, R.R., N. Pamment and P.F. Greenfield. 1981. Alcohol fermentation by yeasts: the effect of environmental and other variables. *Proc. Biochem.* April/May: 42-49.
9. Wiegel, J. 1980. Formation of ethanol by bacteria. A pledge for the use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industrial ethanol fermentation processes. *Experimentia* 36: 1434-1446.
10. Han, M.S. and D.H. Chung. 1992. Cell immobilization of *Zymomonas mobilis* by entrapment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 20: 459-469.
11. Chaplin, M.F. 1986. Monosaccharides. Pp.2-3, In M. F. Chaplin and J.F. Kennedy (ed.), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.
12. Swaine, D.E., and A.J. Daugulis. 1989. Liquid residence time distributions in immobilized cell bioreactor. *Biotech. Bioeng.* 33: 604-612.
13. Han, M.S., S.D. Ha and D.H. Chung. 1991. Studies on the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 19: 390-397.
14. Rhee, S.K., R.J. Pagan, M.F. Lefebvre, L. Wong, and P.L. Rogers. 1984. Ethanol production from desalted molasses using *Saccaromyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*. *J. Ferment. Technol.* 61: 533-537.
15. Swings, J. and J.D. Ley. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Reviews* 41: 1-46.
16. Rogers, P.L., M.L. Skotnicki, D.E. Tribe and K.J. Lee. 1980. Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotech. Lett.* 2: 339-344.
17. Margaritis, A., P. Bajpai and M.A. Lachance, 1983. The use of free and immobilized cells of *Debaryomyces polymorphus* to produces ethanol from Jerusalem Artichoke tubers. *J. Ferment. Technol.* 61: 533-537.
18. Laudrin-Seiller, M.T., J.L. Uribelarrea and G. Goma. 1984. Alcoholic fermentation by *Zymomonas mobilis*; Effect of initial substrate on physiological parameters. *Biotech. Lett.* 6: 477-480.
19. Torres, E.F. and J. Baratti, 1988. Ethanol production from wheat flour by *Zymomonas mobilis*. *J. Ferment. Technol.* 66: 162-172.
20. Nishizawa, Y., Y. Mitani, K. Fukunishi, and S. Nagai, 1984. Ethanol production by repeated batch culture with hollow fibers. *J. Ferment. Technol.* 62: 41-47.
21. Baratti, J., V.K. Jain, and I. Toran-Diaz, 1985. Preparation and characterization of immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Biotech. Bioeng.* 27: 273-279.
22. Lee, J.H., M.L. Skotnicki, and P.L. Rogers. 1982. Kinetic studies on a flocculent of *Zymomonas mobilis*. *Biotech. Lett.* 4: 615-620.
23. Hur, B.K., Ryoo, J.S. and Mok, Y.J. 1989. Investigation of ethanol fermentation characteristic of *K. fragilis* by semicontinuous culture. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 4: 185-190.

(Received June 18, 1992)