

## 새로운 Alginate 고정화 방법에 의한 에탄올 생산

김은영 · 김승욱\* · 김 근  
수원대학교 유전공학연구소

### Ethanol Production by a New Method of Alginate-Immobilization

Kim, Eun-Young, Seung-Wook Kim\* and Keun Kim

*Institute of Genetic Engineering, The University of Suwon  
Suwon P.O. Box 77, Suwon 445-743, Korea*

**Abstract**—When the cells of yeast K35 were immobilized in Ca-alginate gel, cell concentration and viability decreased as alginate concentration increased. Considering the results, 2% (w/v) Ca-alginate concentration would be suitable. Among various concentrations of additives and cross-linking agent, the addition of 1.67% (w/v) of bentonite together with 0.33% (v/v) of glutaraldehyde (ABG bead) resulted in the highest ethanol production of 1.8% (w/v), using YPD medium containing 2% glucose. ABG bead seemed to be more resistant to phosphate ion than Ca-alginate bead. 0.33% (w/v) of phosphate was a proper concentration for the ethanol production by ABG bead. Scanning electron microscopic observation depicted that the immobilized cells on the bead surface were coated by alginate gel and that the cells in the internal bead were cross-linked with alginate matrix. When repeated-batch culture was performed with ABG bead for 40 days in a packed-bed reactor, ethanol concentration of about 90~110 g/l-gel was maintained. Cell viability was maintained around 70%, and outgrowing cell concentration was below 6.3% of total cell concentration. Consequently, the results showed that ABG bead was a potential carrier for continuous production of ethanol compared to the conventional Ca-alginate bead.

고정화 세포를 이용한 에탄올발효는 배양하는 동안 균체가 유실되지 않고 높은 균체농도를 유지할 수 있고, 세포가 고정화된 담체에 보호되어 있으므로 높은 유속으로 배양이 가능하고 다른 미생물로부터의 오염률이 적다(1-3). 뿐만 아니라 균체의 재사용이 가능하고 연속 배양을 할 수 있으며 반응 정도를 조절할 수 있다(4).

균체고정화에는 여러가지 방법이 시도되었으나 중요한 것으로는 비반응물질표면에 부착시키는 흡착법(adsorption)과 물질내에 가두어 두는 포괄법(entrapment)이 있는데, 포괄법은 다량의 균체를 고정시킬 수 있어 흡착법보다도 더 많이 쓰인다(4). 그러나 단점으로는 세포고정화 과정에서 열이나 화학적처리가 세포의 안정성에 관여하여 세포의 생존능력을 훼손할

수 있으므로 화학적 성질을 잘 고려하여야 한다(5, 6). 일반적으로 포괄법을 위한 고정화 담체로서 Ca-alginate, carrageenan, gelatin, chitosan, polyacrylamide gel, carboxymethyl cellulose 등을 사용하여 고정화의 안정성과 높은 고정화 효과를 얻기 위한 방법이 연구되고 있다(3, 7). 이 중에서 에탄올 발효공정에서는 대량으로 손쉽게 구할 수 있고, 고정화 과정이 저렴하고, 장기간 동안 기계적 강도가 우수하며 무독성의 천연고분자인 calcium-alginate를 이용한 포괄법이 가장 많이 사용되고 있다(6, 8, 9). 이 방법의 주된 단점으로 지적되고 있는 것은 phosphate와 같은 calcium-chelating agent의 존재하에 calcium-alginate gel이 쉽게 파괴될 수 있다는 것이다(5). 이 문제는 발효액내에의 phosphate 농도를 가능한 한 줄임으로써 해결할 수도 있겠으나, 발효매지내에 phosphate는 발효균의 정상적인 기능을 유지하는데 필수적인 요소이므로, 다른 방법으로 phosphate에 안정한 algi-

**Key words:** Immobilization, ethanol

\*Corresponding author

nate bead가 개발되어야 한다. 또한 더욱 우수한 고정화담체가 되기 위해서는 일반적인 기계적 강도가 우수하며 오래동안 사용할 수 있고 많은 세포를 함유할 수 있으며 누출되는 세포수가 적어야 함과 동시에 물질의 이동이 원활하여 세포생존력이 좋고, 특히 에탄올 생산이 많아야 할 것이다.

이상과 같은 배경으로, 본 연구에서는 기존의 alginate gel의 단점을 보완하고 더 나아가 에탄올 생산을 증대시킬 수 있는 개발된 alginate gel 고정화 방법을 개발하고자 하였고, 에탄올생산 우수균주를 개발된 담체에 고정화하여 실제 에탄올 생산을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 연구소에서 보관중인 에탄올생산 우수효모균주인 K35를 Malt extract agar 배지에서 30°C 에 2일간 배양시킨 후 4°C 에서 보관하였다.

### 배지 및 발효

종균배지는 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose를 사용하였고 30°C 의 rotary shaking incubator에서 1일간 배양시킨 후 접종액으로 사용하였다. 에탄올 생산배지로 5% dextrose, 0.25% yeast extract, 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub>, 0.0001% FeSO<sub>4</sub>를 사용하였고 배양배지의 초기 pH를 조절하기 위하여 멸균전에 pH를 0.1 N HCl이나 0.1 N NaOH를 이용하여 4.0으로 조정하였다. 회분식 발효는 100 ml 종균배지 또는 생산배지를 포함한 250 ml Erlenmeyer 플라스크에서, 반복회분식 발효는 생산 배지 150 ml를 포함하는 400 ml 부피의 충전담 반응기에서 혐기성, 정지배양을 하였다. 모든 발효는 30°C 에서 행하였다(10).

### 고정화 방법

Na-alginate(high viscosity, Sigma chemical Co.)를 적당한 농도로 증류수에 넣어 magnetic stirrer로 녹인 후 121°C, 15 psi에서 멸균하여 만든 후 같은 부피의 균체 현탁액을 잘 섞은 후, peristaltic pump를 사용하여 주사바늘(21 gauge)를 통해 경화용액에 떨어뜨려 직경이 2~3 mm의 bead를 제조하였다. Bead의 완전한 겔화를 위해 4°C 에서 12시간 동안 경화용액에 보관하였다. 첨가제나 가교제를 혼합하는 경우에는 30 ml의 2%(w/v) alginate에 적절한 농도의 흡착제나

가교제를 첨가하여 bead를 제조하였다.

첨가제로서 silica(Shinyo chemical Co.), alumina(Shinyo chemical Co.), bentonite(Shinyo chemical Co.)를 이용하였고, 가교제로는 glutaraldehyde(Fluka Chemical A.G.)를 이용하였다.

### SEM(Scanning Electron Microscopy)에 의한 관찰

발효전 또는 발효후에 일정시간마다 시료를 채취하여 담체의 표면과 단면을 관찰하기 위해 전처리를 하였다. 전처리는 2.5% glutaraldehyde 용액이 포함된 cacodylate buffer(pH 7.2) 또는 Tris buffer(pH 7.2)에 1시간 동안 4°C 에서 고정시킨 후 cacodylate 또는 Tris buffer(pH 7.2)로 30분 동안 4°C 에서 담그어 세척을 한다. 에탄올 농도를 10~100%로 단계적으로 높여가며 탈수시켜 acetone으로 처리후 amylacetate를 30분 간격으로 2번 처리하여 CO<sub>2</sub> 감압하의 31°C critical point dryer에서 건조한 후 금으로 coating하여 Scanning Electron Microscope로 관찰하였다.

### 분석 방법

Glucose의 농도는 발효액을 원심분리시켜 얻은 상등액을 DNS 방법(11)을 이용하여 분광광도계(Hitachi U-100, Japan)로 575 nm에서 흡광도를 측정하여 얻었다. 생산된 에탄올은 Bernet와 Gutman(12)의 방법을 이용하여 효소적으로 정량하였으며 340 nm에서 흡광도를 측정하여 에탄올을 정량하였다. 세포생존률은 methylene blue staining법(13)을 이용하여 측정하였고, 균체수는 발효액을 일정량 희석한 후 haemocytometer를 사용하여 계산하였으며, 균체량은 분광광도계로 570 nm에서 측정하여 calibration curve에 의해 환산하여 건조중량을 얻었다. Gel내의 균체수와 균체농도는 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 후 앞의 방법과 같이 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Alginate 농도에 따른 영향

Table 1은 alginate 농도에 따른 에탄올 발효시작 24시간 후의 특성을 보여준다. Bead의 안정성은 사용된 alginate의 농도에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다(5, 14, 15). Alginate 농도가 증가할수록 균체량은 감소하고 세포생존률도 낮아지는데, 특히 3%까지는 80%의 생존률을 유지했으나 4%에서는 66.7

**Table 1. Effect of alginate concentration for immobilization on ethanol fermentation (2% YPD medium)**

Alginate conc. (% w/v)	Residual glucose (g/l)	Ethanol (g/l)	Cell conc. (g cell/l-gel)	Cell viability (%)	Outgrowing cell (%)
1	0.39	16.0	59.34	96.7	19
2	0.39	14.8	54.76	87.8	10
3	0.41	14.0	45.47	80.0	9
4	0.40	11.6	44.46	66.7	4

All measurements were made at 24 hr cultivation.

**Table 2. Effect of different types of alginate gel formed by different hardening solutions for immobilization on ethanol fermentation (2% YPD medium)**

Type of gel (2.0%, w/v)	Residual glucose (g/l)	Ethanol (g/l)	Cell conc. (g cell/l-gel)	Cell viability (%)	Outgrowing cell (%)
Ca-alginate	0.44	15.6	42.20	87.5	9.4
Ba-alginate	0.43	15.6	40.47	80.0	14.0
Sr-alginate	0.41	16.6	46.57	81.0	5.1

All measurements were made at 24 hr cultivation.

%의 낮은 생존률을 나타낸다. 이는 alginate 농도가 너무 높아짐으로써 물질전달이 잘 일어나지 않아 생기는 현상으로 생각된다. 에탄올 생산은 1%(w/v) alginate를 사용한 경우가 제일 높았지만 bead밖에서 성장한 균체가 총 균체수의 약 19%나 되었다. 이는 bead밖에서 성장한 효모에 의해 생산된 에탄올이 상당히 높았다고 생각된다. 2%와 3%의 경우에는 bead밖에서 성장한 효모의 농도가 약 10% 정도로 나타났고, 2% alginate 농도를 사용했을 때 생산된 에탄올의 농도가 3% alginate의 경우보다 높았다. 그러나 4%의 경우는 bead밖에서 성장한 효모의 농도가 4%로 가장 낮게 나타났으나 에탄올의 생산은 가장 낮았다.

#### 경화용액의 종류에 따른 영향

Alginate를 이용하여 고정화시킬 때 일반적으로 경화용액으로서 CaCl<sub>2</sub> 용액을 가장 많이 사용하고 있다. Gel bead의 강도는 CaCl<sub>2</sub> 농도에 따라 크게 영향을 받으므로 생산물의 생산성과 균체의 안정도를 고려하여 적절한 농도를 사용하는 것이 바람직하다(16, 17). 본 연구에서는 Ca이온 대신 Cu, Ba, Sr 등의 금속이온을 사용했을 때 에탄올의 생산을 살펴보았다. Table 2에서 보는 바와 같이 에탄올의 농도는 Sr-alginate를 사용한 경우가 높은 생산을 보였고 Ca-algi-

nate와 Ba-alginate는 같은 농도를 생산하였다. 균체의 농도도 Sr-alginate의 경우가 제일 높았고 Ca- 및 Ba-alginate의 경우는 Sr-alginate보다 낮았다. 그러나 세포생존률은 Ca-alginate의 경우가 87.5%로 제일 좋았고, Ba-와 Sr-alginate는 80%와 81%로 나타났다. Bead밖에서 성장한 효모의 농도를 보면, Ba-alginate의 경우가 14.0%로 다른 bead에 비해 높았고, Sr-alginate의 경우는 5.1%로 상대적으로 매우 낮았다. 이는 Sr-alginate bead의 강도가 좋다는 것을 보여준다. Cu-alginate bead의 경우는 에탄올 생산배지에서 배양시킬 때 bead밖으로 Cu이온 특유의 푸른색이 빠져 나오고 세포생존률도 낮아진다. 이 과잉의 Cu이온이 세포의 성장을 억제하며 에탄올 생산을 못하게 함으로써 경화용액으로는 부적당한 것으로 여겨진다

#### 첨가제의 영향

본 절에서는 흡착제를 이용하여 bead의 기계적 강도, 화학적 안정성을 높이려고 시도하였다. 흡착제인 silica(SiO<sub>2</sub>), alumina(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 및 bentonite(Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·4SiO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O)를 각각 alginate에 첨가하여 제조한 bead의 강도, 에탄올 생산, 세포생존률에 미치는 영향은 Table 3에서 보여준다. 생산된 에탄올의 농도는 첨가제를 사용했을 때의 경우가 더 높은 균체량을 갖는 것을 알 수 있었다. 특히 bentonite를 첨가제로

**Table 3. Effect of various additives for immobilization on ethanol fermentation (2% YPD medium)**

Additives (1.67%, w/v)	Residual glucose (g/l)	Ethanol (g/l)	Cell conc. (g cell/l-gel)	Cell viability (%)	Outgrowing cell (%)
None	0.44	14.0	42.20	87.5	9.4
Silica	0.47	13.8	53.30	76.5	8.7
Alumina	0.43	14.0	50.50	85.7	26.7
Bentonite	0.44	14.8	58.47	88.9	8.9

All measurements were made at 24 hr cultivation.

**Table 4. Effect of bentonite concentration for immobilization on ethanol fermentation (2% YPD medium)**

Bentonite conc. (%, w/v)	Ethanol (g/l)	Cell conc. (g cell/l-gel)	Cell viability (%)	Outgrowing cell (%)
0.00	14.0	42.20	87.5	9.4
1.67	14.8	58.40	88.9	8.9
3.33	13.1	36.50	90.3	10.9
6.67	12.0	34.30	N.D**	N.D**

All measurements were made at 24 hr cultivation.

\*\* : Not determined.

**Table 5. Effect of glutaraldehyde concentration for immobilization on ethanol fermentation (2% YPD medium)**

Glutaraldehyde conc. (%, v/v)	Ethanol (g/l)	Cell conc. (g cell/l-gel)	Cell viability (%)	Outgrowing Cell (%)
0.00	1.40	42.20	87.5	9.4
0.33	1.32	32.60	87.2	10.6
0.66	0.80	20.30	88.0	12.9

All measurements were made at 24 hr cultivation.

사용하였을 때 가장 높은 균체량을 얻었다. 세포생존률은 bentonite와 alumina를 사용한 경우가 첨가제를 사용하지 않은 경우와 거의 비슷한 수준을 유지하였으며, silica를 사용한 경우는 다소 떨어지는 것을 알 수 있다. Bead밖에서 성장한 균체를 보면 silica 및 bentonite를 사용한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 낮았고, alumina를 사용한 경우에는 bead밖에서 균체가 상당히 성장되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 bentonite의 경우는 균체의 농도와 에탄올 생산 뿐만 아니라 세포생존률도 높아 에탄올 연속 생산을 위한 효모의 고정화에 첨가제로 쓰일 수 있는 가능성을 제시하여 준다.

#### Bentonite 및 가교제 농도의 영향

Table 4는 bentonite 농도에 따른 에탄올발효의

결과를 보여준다. 세포생존률이나 bead밖에서 성장하는 균체량은 bentonite를 첨가하지 않은 경우와 거의 비슷하였고, bentonite 농도에 따른 영향이 거의 없었다. 그러나 에탄올 생산과 균체의 농도는 1.67% (w/v)의 bentonite를 첨가했을 때 가장 높은 값을 나타내었고, bentonite를 첨가하지 않았을 때의 1.40% (w/v)보다 0.08%(w/v)가 더 높게 나타났다. 균체의 농도도 1.67%(w/v)의 bentonite를 사용한 경우가 첨가하지 않은 경우와 3.33%(w/v)의 bentonite를 사용했을 때나 6.67%(w/v)의 bentonite를 사용한 경우보다 훨씬 높게 나타났으며 bead밖에서 자란 균체도 가장 적었다. 일반적으로 alginate bead의 강도를 높이기 위해 glutaraldehyde, hexamethylenediamine 등의 가교제를 사용하여 화학적 처리를 하는 방법들이 있다 (18, 19). 이들 중 glutaraldehyde를 이용한 방법들은

**Table 6. Effect of bentonite (1.67%, w/v) and glutaraldehyde (0.33%, w/v) mixture used for immobilization on ethanol fermentation (2% YPD medium)**

Mixture		Ethanol (g/l)	Cell conc (g cell/l-gel)	Cell viability (%)	Outgrowing cell (%)
Bentonite (%, w/v)	Glutaraldehyde (%, w/v)				
0.00	0.00	14.0	42.20	87.5	9.4
0.00	0.33	13.2	32.60	87.2	10.6
1.67	0.00	14.8	58.40	88.9	8.9
1.67	0.33	18.0	67.70	96.7	6.8

All measurements were made at 24 hr cultivation.

**Table 7. Effect of phosphate concentration (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in 5% production medium on ethanol fermentation**

Beads	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%, w/v)	Ethanol (g/l)	Cell conc. (g cell/l-gel)	Cell viability (%)	Outgrowing cell (%)
Ca-alginate	0.33	26.0	70.1	95.1	1.4
	1.67	26.8	80.3	90.0	1.0
	3.33	9.2	80.0	95.8	1.9
Sr-alginate	0.33	31.6	83.8	88.9	2.1
	1.67	24.4	78.5	91.6	0.5
	3.33	15.6	79.5	93.8	2.0
ABG	0.33	33.6	112.0	82.7	0.9
	1.67	24.0	107.2	91.3	2.9
	3.33	12.0	85.0	83.3	0.6

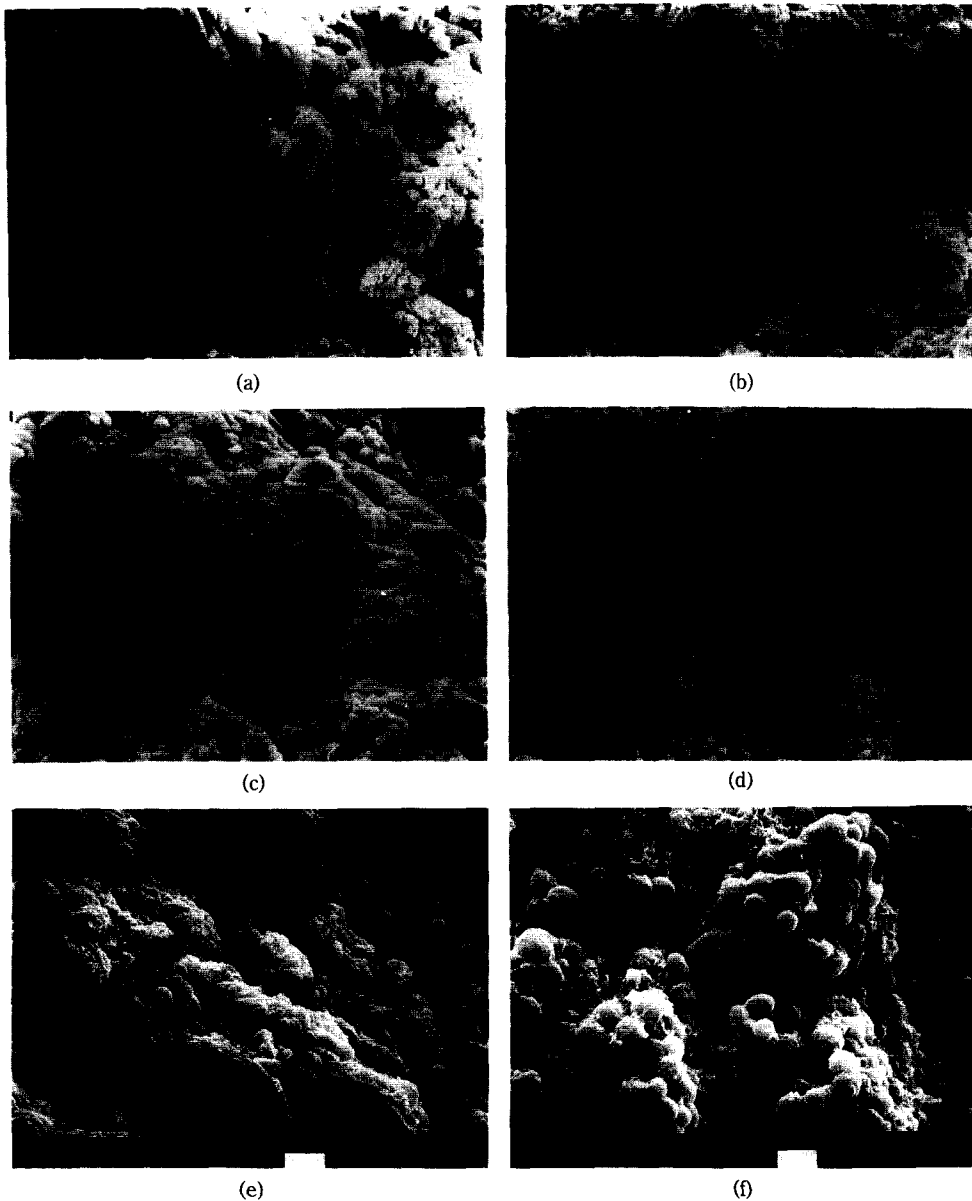
All measurements were made at 72 hr cultivation.

대개 alginate bead를 만든 다음 적절한 농도의 glutaraldehyde 용액과 cross-linking시키는 것이었다. 그러나 본 실험에서는 glutaraldehyde를 alginate 용액에 첨가시켜 bead를 만들거나, 첨가제와 혼합시켜 bead를 만들었을 때의 영향에 대해 알아보았다. 가교제인 glutaraldehyde(25%)를 alginate 용액에 각각 0.33% (v/v)와 0.66%(v/v)를 첨가시켜 만든 bead에 의한 에탄올발효는 Table 5에 보여준다. 균체의 농도와 에탄올 생산은 glutaraldehyde를 첨가했을 때 오히려 첨가하지 않은 경우에 비해 낮아지는 것을 볼 수 있다. 뿐만 아니라 bead밖에서 성장한 균체량은 오히려 증가하였고, 세포의 생존률은 거의 비슷한 수준을 보이고 있다. 이는 아마도 glutaraldehyde 자체의 독성에 따른 결과로 생각된다. 이상의 결과를 토대로 가교제와 흡착제를 함께 첨가시켰을 때는 어떤 영향이 있는지 알아보았다. Bentonite와 glutaraldehyde를 2%

(w/v) alginate 용액과 혼합하여 만든 bead에 효모를 고정화 하였다(Table 6). 에탄올 생산은 흡착제인 bentonite만 1.67%(w/v)을 넣었을 때보다 높았고, glutaraldehyde 0.33%(v/v)를 넣었을 때나 아무 것도 첨가하지 않았던 Ca-alginate의 경우보다도 많은 에탄올을 생산하였고, 균체의 농도도 높았으며 세포생존률도 매우 좋았다. Bead밖에서 성장한 균체도 bentonite 1.67%(w/v)를 첨가했을 때나 glutaraldehyde 0.33%(v/v)를 넣었을 때보다 매우 적은 편으로 bead의 강도 또한 좋은 것으로 생각된다. 결과적으로 bentonite 1.67%(w/v)와 glutaraldehyde 0.33%(v/v)를 함께 alginate용액에 혼합시켜 제조한 bead(ABG bead)를 이용한 경우가 에탄올발효에서 좋은 결과를 얻었다.

#### Phosphate 농도의 영향

앞 절에서 제조된 bead들을 이용하여 phosphate를



**Fig. 1. Scanning electron microscopic observation of immobilized yeast cells.**

(a) Gel surface in Ca-alginate+Bentonite gel bead before fermentation (b) Internal surface in Ca-alginate+Bentonite gel bead before fermentation, (c) Gel surface in ABG gel bead before fermentation, (d) Internal surface in ABG gel bead before fermentation, (e) Gel surface in ABG gel bead after 3 days fermentation, (f) Internal surface in ABG gel bead after 3 days fermentation.

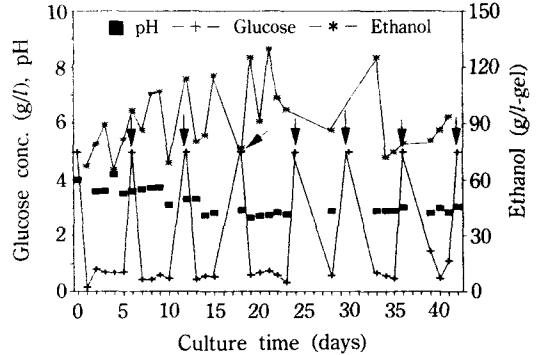
포함하는 생산배지에서 에탄올 발효를 할 때 이들 bead들이 chelating agent인 phosphate ion에 안정해야 한다. 그래서  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 의 농도가 Ca-alginate bead, Ca-alginate에 bentonite와 glutaraldehyde를 첨가한 bead(ABG bead) 및 Sr-alginate bead에 어떤

영향을 미치는지 알아보았다. Table 7에서 보면 phosphate의 농도에 따라 생산된 에탄올의 농도는 Ca-alginate의 경우는  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.33%(w/v)과 1.67%(w/v)의 경우에 거의 비슷한 에탄올 생산을 보였고  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3.33%(w/v)에서는 에탄올 생산이 낮아짐을 알

았으며, ABG bead와 Sr-alginate bead는  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 가 0.33%(w/v) 포함된 배지에서 가장 높은 값을 보여준다. 일반적으로 phosphate의 농도가 증가함에 따라 에탄올 생산성이 낮아지는 것을 볼 수 있다.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 가 0.33%(w/v) 포함된 배지에서 각각의 bead의 에탄올 생산을 비교하면 ABG bead가 제일 높았고, Sr-alginate bead를 사용한 경우가 Ca-alginate보다 높았다. 균체의 농도를 보면 ABG bead의 경우가 가장 높았고 Sr-alginate의 경우가 Ca-alginate bead에서 보다 높은 균체농도를 나타내어, 가교제와 첨가제를 넣은 경우에 균체의 농도가 높은 것으로 나타났다. 세포생존률은 Ca-alginate bead의 경우가 가장 좋았고 ABG bead와 Sr-alginate bead에서는 좀 떨어지는 경향이 있었지만 최소한 80% 이상을 유지하였다. 이는 첨가제와 가교제가 포함된 경우에는 단위부피당 균체량도 많고 첨가제와 가교제의 강한 결합력과 bead 중앙부분의 균체의 물질전달이 용이하지 않기 때문인 것 같다. Bead밖에서 성장한 균체를 보면 Sr-alginate bead의 경우는 2% 정도를 나타냈으나 ABG bead의 경우는  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 의 농도가 1.67%(w/v) 일 때의 2.9%를 제외하고는 1% 미만을 나타내어 ABG bead의 경우가 낮은 수준을 보였다. 결과적으로  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 의 농도는 0.33%(w/v)가 적합하였고 장기간 배양을 고려할때 세포생존률은 조금 떨어지지만 첨가제와 가교제를 첨가한 bead(ABG bead)가 에탄올 생산이 높고 bead밖에서 성장하는 균체도 적으며 균체의 농도도 높게 나타남으로써 phosphate 이온에 대한 안정성이 향상된 것으로 생각된다.

**SEM에 의한 관찰**

Fig. 1의 SEM를 보면 bentonite를 첨가시켜 제조한 Ca-alginate bead를 발효전에 관찰한 결과, 표면은 아주 미세한 pore가 있는 바위같은 느낌으로 세포들이 coating되어 있는 것을 볼 수 있었고 bead 내부를 보았더니, bentonite들에 의해 세포들이 응집되어 bead안에 모여 있으면서 그룹을 이루는 것처럼 보였다. 첨가제와 가교제를 함께 첨가시켜 제조한 Ca-alginate bead의 표면은 bentonite만 첨가시켰던 bead 표면보다 조밀하며 전체적으로 bead의 세포들이 고르게 분포되어 매끄럽게 보였고, 내부는 bentonite만 첨가했을 때와는 다르게 세포들이 고르게 bead내에 퍼지면서 bentonite의 작용으로 응집되면서도 그들 사이에 가교된 모습이 관찰되었다. (e)와 (f)는 3일 배양후 ABG gel bead를 관찰한 결과로 표면에 약간



**Fig. 2. Repeated-batch culture by using ABG (alginate + bentonite + glutaraldehyde) gel bead for ethanol production.**  
 ▼; fresh medium (5% production medium) added.

세포들이 노출된 부분도 있지만 전체적으로 발효전과 거의 유사하였고, bead 내부는 세포들이 많이 성장하였고 세포수가 증가되었음을 알 수 있다.

**반복회분식 배양에 의한 에탄올 생산**

2%(w/v) Ca-alginate에 1.67%(w/v)의 bentonite와 0.33%(v/v)의 glutaraldehyde를 첨가시켜 제조한 bead (ABG gel bead)를 5%(w/v) glucose가 포함된 발효 배지를 이용하여 충진탑 반응기에서 반복회분식 배양을 실시한 결과 약 40일간 배양시켰을 때 평균적으로 90~110 g/l-gel의 에탄올 생산을 보였고 세포 생존률은 평균 70% 이상을 유지하였으며, bead밖에서 성장하는 균체는 1~10일 배양했을 때는 거의 없었고, 약 40일간 배양하였어도 4.5 g/l 정도로 효모의 유출 정도가 낮은 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 그러므로 ABG gel bead의 경우 장기간 연속배양의 가능성이 있고, 에탄올 생산도 거의 일정 수준을 유지할 수 있다는 결과를 얻었다.

**요 약**

에탄올 생산효모주인 K35를 Ca-alginate에 고정 화시켰을 때 Ca-alginate의 농도가 증가할수록 균체량은 감소하였고 세포생존률도 낮아졌다. Alginate 농도는 2%(w/v)의 경우가 적절하였다. 다양한 첨가제와 가교제를 첨가하였을 때, 이용한 농도중 bentonite 1.67%(w/v)와 glutaraldehyde 0.33%(v/v)를 함께 첨가했을 때(ABG bead) 그 효과가 가장 좋았고, 2% glucose 기질을 포함한 YPD 배지에서 가장 높은 농

도인 1.8%(w/v) 에탄올을 생산하였다. ABG bead는 Ca-alginate bead보다 phosphate 이온에 더 안정한 것으로 보인다. 0.33%(w/v)의 phosphate가 포함된 생산배지에서 ABG bead의 경우가 에탄올의 농도가 가장 높았다. SEM(Scanning Electron Microscopy)를 통해 ABG gel bead의 구조를 관찰하였는데, bead 표면구조는 고정화된 세포가 alginate에 싸여 있고, 내부구조는 alginate와 세포 사이에 가교된 모습이였다. ABG gel bead를 충전담 반응기에서 반복회분식 발효를 약 40일간 계속하였을 때 90~110 g/l-gel의 에탄올 생산을 보였고 세포생존률도 평균 70%를 유지했으며, bead밖에서 성장한 균체의 농도도 전체 균체농도의 6.3% 이하로 낮았다. 그러므로 첨가제와 가교제를 첨가했을 때 기존의 Ca-alginate bead보다 훨씬 우수한 담체로써 연속배양의 가능성을 보여준다.

### 감사의 글

본 연구는 상공자원부의 대체에너지 기술개발사업비의 일부에 의해 수행된 것입니다.

### 참고문헌

- Kosaric, N., D.C.M. Ng and G.S. Steward. 1980. Ethanol production by fermentation: An alternative liquid fuel. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 147-227.
- Mariorella, B., C.R. Wilke and H. Blanch. 1981. Alcohol production and recovery. *Adv. Biochem. Eng.* **20**: 43-92.
- Nunez, M.J. and J.M. Lema. 1987. Cell immobilization: Application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 561-642.
- Goida, F., C. Casas and C. Sola. 1987. A survey of continuous ethanol fermentation systems using immobilized cells. *Process Biochem.* **4**: 43-48.
- Cheetham, P.S.J., K.W. Blunt, and C. Bucke. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 2155-2168.
- Smidsrød, O. and G. Skjak-Bræk. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnol.* **8**: 71-78.
- Klein, J. and P. Schara. 1980. Entrapment of living microbial cells in covalent polymeric networks: I. Preparation and properties of different networks. *J. Solid Phase Biochem.* **5**: 61-78.
- Hackel, U., J. Klein, R. Megner and F. Wagner. 1975. Immobilization of microbial cells in polymeric matrices. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 291-293.
- Han, M.S. and Chung, D.H. 1992. Ethanol production using alginate immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 5, 588-596.
- Han, M.S., Ha, S.D. and Chung, D.H. 1991. Studies on the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **19**: 390-397.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Bernet, E. and I. Gutmann. 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD. 1499-1502. H.U. Bergmeyer (Ed), *In Methods of enzymatic analysis*: 3 Academic Press, New York.
- Pierce, J.S. 1970. Measurement of yeast viability. *J. Inst. Brew.* **76**: 442-443.
- Tanaka, H., M. Matsumura and I.A. Veliky. 1984. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 53-58.
- Hannoun, B.J.M. and G. Stephanopoulos. 1986. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 829-835.
- Irie, S. and Tanaka, H. 1990. Characteristics and applications of alginate gel bead. *Bioeng.* **7**: 19-29.
- Hulst, A.C., J. Tramper, K. Van't Ret and J.M.M. Westerbeek. 1985. A new technique for the production of immobilized biocatalyst in large quantities. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 870-876.
- Birnbaum, S., R. Pendleton, P.O. Larsson and K. Mosbach. 1981. Covalent stabilization of alginate gel for the entrapment of living whole cells. *Biotechnol. Lett.* **3**: 393-400.
- Ohlson, S., P.O. Larsson and K. Mosbach. 1979. Steroid transformation by living cells immobilized in calcium alginate. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 103-110.

(Received June 16, 1993)