

Aspergillus awamori와 Zymomonas mobilis로 구성된 혼합고정화 배양계의 최적 조건

이상원 · 박석규*¹ · 손봉수 · 최수철 · 서권일 · 성낙계 · 김홍출

경상대학교 식품공학과

*순천대학교 식품영양학과

Optimal Conditions of Co-Immobilized Mixed Culture System with Aspergillus awamori and Zymomonas mobilis

Sang-Won Lee, Seok-Kyu Park*¹, Bong-Soo Shon, Soo-Cheul Choi, Kwon-Il Seo,
Nack-Kie Sung and Hong-Chul Kim

Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

Co-immobilized mixed culture system (A-Z system) composed of two different oxygen-demanding strains, aerobic (*Aspergillus awamori*) and anaerobic (*Zymomonas mobilis*) strains, in a Ca-alginate gel beads was developed to increase ethanol production from raw starch as a carbon source. Optimal mixture ratio of *A. awamori* and *Z. mobilis* was 1.25×10^9 spores/L-gel and 0.5g cells/L-gel, respectively. After 120 hours of cultivation, gel beads distinguished oxygen-rich surface for *A. awamori* from oxygen-deficient central part for *Z. mobilis*. At A-Z culture system, yield of ethanol on glucose, $Y_{p/s}=0.18$, was very low and there was high leakage of cells from surface of gel beads. At A-Z 36 culture system with changing silicon check valve for cotton plug at 36 hours in A-Z culture system, there was no cell leakage from gel beads, pH was maintained at around 4.3 during cultivation, and yield of ethanol on glucose, $Y_{p/s}=0.36$, showed 2 times higher than that of control culture system (cotton plug culture).

Key words : co-immobilization, *Aspergillus awamori*, *Zymomonas mobilis*, ethanol production, raw starch

서 론

막대한 양으로 매년 지구상에서 생산되고 있는 biomass는 재생가능한 석유 대체 에너지 원료 중의 하나로 주목을 받고 있다. 이러한 biomass는 일반적으로 난분해성 다당으로 구성되어 있기 때문에 발효원료로 이용하기 위해서 당화나 증자 등의 전처리가 필요한데, 이때의 에너지는 biomass로부터 물질 생산에 필요한 전체 에너지의 25~30% 달한다(1). 한편 biomass로부터 유용물질의 생산은 전처리, 당화 및 발효과정의 3 단계를 거쳐야 하기 때문에 조작이 복잡하고 많은 경비와 에너지가 필요로 한다. 따라서 biomass를 전처리하지

않고 당화와 발효를 동시에 행할 수 있는 system의 개발은 매우 중요하다고 생각된다.

미생물을 이용한 유용물질의 생산을 효율적으로 행하기 위해서 여러 가지 배양방법이 보고되어져 왔다. 그 중에서도 고분자 담체내에 미생물세포를 그대로 고정화하는 포괄고정화법은 방법이 간단하고, 미생물을 고정화시킨 상태에서 세포의 증식이 가능하며, 또 장시간 이용이 가능하다는 장점이 있다(2,3). 그러나 세포를 고정화한 gel bead 자체는 산소나 영양물질의 이동을 저해하기 때문에 발효 속도를 억제시키는 매우 큰 결점을 갖고 있다(4). 특히 호기성 미생물을 고정화할 경우는 균중식이 gel bead 표면부에만 증식하고, 반대로 혐기성 미생물을 고정화할 경우는 균체 증식이 gel bead 중심부에만 제한되기 때문에, gel bead 전체에 고

¹To whom all correspondence should be addressed

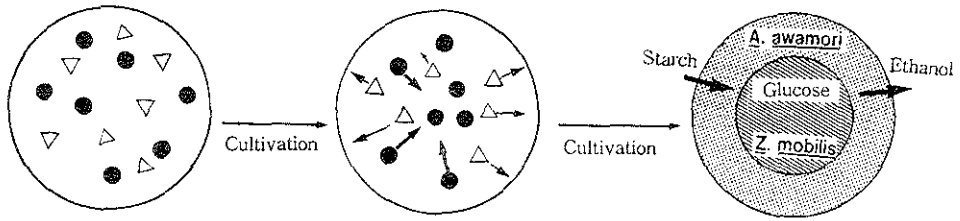


Fig. 1. Conception of coimmobilized mixed culture system of *A. awamori* and *Z. mobilis* (A-Z culture system) in Ca-alginate gel beads system.

● : Anaerobic △ : Aerobic

밀도의 세포를 증식시키기 어렵다는 것이 알려져 있다 (3,5,6). Osuga 등 (7)은 초산 생산을 위하여 고정화 세포내에 순수한 산소를 고압하에서 38ppm 까지 높였지만, 균증식은 gel bead 표면으로부터 150~200 μ m의 범위내 한정되어, gel bead 전체를 유용하게 사용하지는 못하였다고 보고하였다. 본 연구자들은 이런 점을 토대로 하여 산소가 부족한 gel bead 중심부분을 혐기적 세균의 생육장소로서, 또한 산소가 풍부한 표면부분을 호기성균의 생육장소로서 이용하는 것에 착안하였다. 즉, 호기성의 *Aspergillus awamori*와 혐기성의 *Zymomonas mobilis*를 동일 gel bead내에 혼합고정화하여 배양하면 gel bead내의 고정화 균주는 배양과정에서 산소요구성의 차이에 따라 생육 장소가 두 부분으로 나누어질 것으로 추측된다 (Fig. 1).

따라서 본 연구에서는 gel bead의 표층부에 생육하는 *A. awamori*는 생전분에서 glucose를 생산하고, 중심부에 생육하는 *Z. mobilis*는 glucose로부터 에탄올을 생산하므로 인하여 당화와 발효과정이 1단계로 동시에 일어날 수 있는 혼합화 배양계의 기초적 연구를 행하였고, 두 균주의 혼합비, 배양조건 및 gel bead에 생육하는 균주의 분포상태를 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

생전분을 분해하는 호기성의 곰팡이로서는 amylase 생산균인 *A. awamori* IFO 4033을 사용하였으며, potato dextrose agar (PDA)배지에서 30°C로 5일간 배양하여 포자를 형성시켰다. 혐기성균으로서는 에탄올 생산균인 *Z. mobilis* IFO 13756을 사용하였으며, 균주는 액체 배지(glucose 1%, yeast extract 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2%, pH 6.8)에서 30°C로 18시간 동안 정치배양하였다.

본 배양배지는 peptone 0.5%, yeast extract 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2% (pH 5.5)를 함유한 것을 사용하였다. 탄소원으로서는 2%의 쌀 생전분을 사용하였으며, 가열살균에 의한 열분해를 피하기 위하여 γ -선 조사 (36~42K Gy, 6시간)에 의하여 멸균하였다.

혼합고정화 및 배양

혼합고정화할 때 곰팡이의 포자현탁액은 곰팡이 사면배지에 tween 80이 포함된 멸균수 10ml를 넣어 포자 농도가 $1.25 \times 10^6 \sim 10^8$ spore/L-gel로 되게 하였으며, 세균의 세포현탁액은 *Z. mobilis*를 증식매지(glucose 10%, yeast extract 1%, KH_2PO_4 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, pH 5.0) 30ml 중에서 30°C로 18시간 동안 정치배양한 후의 배양액을 원심분리하여 세포현탁액의 농도가 0.5~1.0g cell/L-gel로 되게 하였다.

A. awamori 및 *Z. mobilis*의 단독고정화 배양할 때에는 각각의 포자 및 세포현탁액을 3% Na-alginate용액에 정량적으로 첨가하고, 0.1M $CaCl_2$ 용액 150ml 중에 떨어뜨린 후, 1시간 동안 온화하게 교반하여 gel화를 행한 다음, 직경 3mm 정도의 gel bead를 만들었다.

혼합고정화의 비율검토는 곰팡이의 포자현탁액 및 세균의 세포현탁액을 여러 가지 비율로 3% Na-alginate용액 50ml 중에 혼합한 후 단독 고정화법과 동일하게 만들었으며, 그 중의 gel bead 35g을 200ml의 본 배양의 배지를 함유한 500ml 삼각플라스크로 옮겨 30°C로 120시간 동안 진탕배양(220rpm)을 행하였다.

산소의 공급

호기적 배양은 전천을 이용하였으며, 혐기적 배양은 본 연구에서 특수제작한 check valve가 부착된 실리콘 plug를 이용하였다 (Fig. 2). 혐기적 조건을 위한 산소공

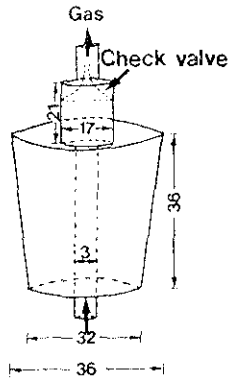


Fig. 2. Silicon plug with check valve for anaerobic culture. The dimensions are in millimeters.

급 차단은 배양개시 후, 일정시간이 경과하였을 때 면 전을 check valve가 부착된 실리콘 plug로 교환함으로써 이루어지게 하였는데, 이 check valve의 역할은 외기의 산소 유입이 일어나지 않도록 하면서 플라스크 내부가 고압이 되지 않도록 배양액 중에 발생된 탄산가스를 이 valve를 통하여 외부로 방출되도록 하는 것이다.

에탄올 및 당의 분석

배양액 중의 에탄올 농도는 원심분리 (3,500rpm, 15 분)하여 얻은 상정액 2 μ 를 GLC (Yanaco G180)로 측정 하였다. 분석조건은 chromosorb 105 (60-80mesh) column (3.4mm i.d. \times 2m); injector temp., 210 $^{\circ}$ C; column temp., 210 $^{\circ}$ C; detector, FID로 하였으며, 내부표준물질로서는 n-propanol (和光純藥)을 시료 3ml당 120 μ 를 첨가하여 사용하였다. Glucose 농도는 mutalotase · GOD 법 [Glucose-C II -Test Wako, 和光純藥]을 이용하여 정량하였고, 총 당량은 phenol-sulfuric acid법으로 정량하였으며 (8), 비glucose 당량은 총 당량에서 glucose량을 뺀 것으로 하였다. Gel bead 단편의 관찰은 현미경으로 배울 200배에서 행하였다 (9).

결과 및 고찰

A와 Z계의 단독고정화

*A. awamori*의 단독 고정화 (A계)할 때, 포자수를 1.25 \times 10 6 ~10 10 spore/L-gel의 범위로 접종량을 변화시켜 제조한 gel bead를 30 $^{\circ}$ C에서 24-48시간 동안 진탕배양 (220rpm)하여 전분의 가수분해 속도를 비교한 결과 (Fig. 3), *A. awamori*의 포자수가 1.25 \times 10 6 ~10 9 spore

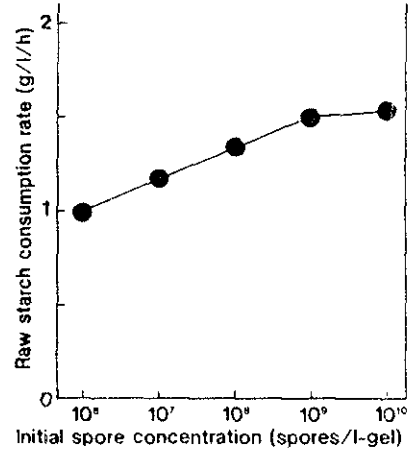


Fig. 3. Relationship between initial spore concentration in the gel beads and raw starch consumption rate by immobilized *Aspergillus awamori*.

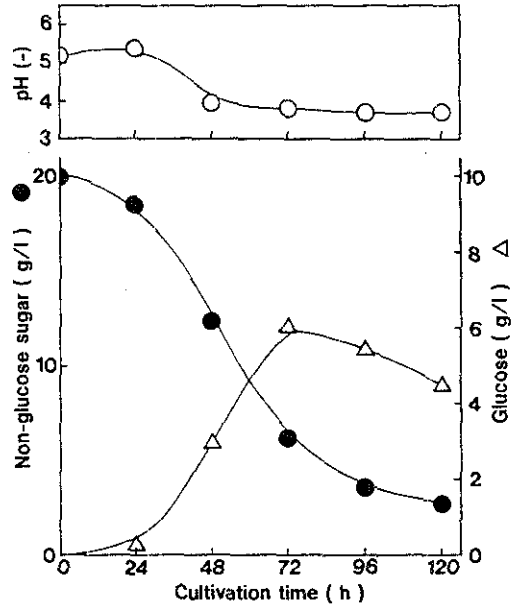


Fig. 4. Hydrolysis of raw starch by immobilized *Aspergillus awamori*.

The initial *Aspergillus awamori* spore concentration in the gel beads was 1.25 \times 10 9 spores/L-gel.

/L-gel로 증가함에 따라 생전분의 가수분해속도가 급격하게 상승하는 경향이 나타났지만, 1.25 \times 10 9 spore/L-gel의 이상에서는 완만하게 증가하였다.

한편, *A. awamori*의 고정화 최적 포자수를 1.25 \times 10 9 spore/L-gel로 하여, 배양액 중의 생전분 가수분해 및 생산되는 glucose량의 변화를 조사한 결과 (Fig. 4), 배양 120시간 까지도 생전분은 완전하게 분해되지 않았으며, 최후에 미분해 상태의 생전분이 약 2.8g/L로

존재하였다. Glucose는 배양 24시간 부터 생산되었으며, 배양 72시간에 생산량이 최대로 되었다(6.11g/L). 그 이후 부터는 점차 감소하는 것으로 보아 균사에 의해서 glucose가 소모되는 것으로 추측된다. pH는 배양 48시간 부터 4.0 이하로 되었으며, gel bead로 부터 배양액 중으로 *A. awamori*의 균사가 누출되는 것이 관찰되었다.

이상의 결과는 Kurosawa 등(10)의 가용성 전분배지에 *A. awamori*를 고정화 배양했을 때, 배양액의 pH는 4.5~5.0로 유지되었고, 배양 36시간째에 glucose 농도가 최대로 되었다(7.5g/L)는 보고에 비하면, 본 실험의 생전분은 난분해성 기질이기 때문에 최대 glucose 축적시간이 길어지고, gel bead로 부터 곰팡이 균사의 누출이 더욱 심하게 일어났으며, 또한 배양액의 pH도 낮았다.

다음으로, *Z. mobilis*의 세포 농도를 gel bead내에서 0.25, 0.5, 1.0g cell/L-gel로 고정화시켜(Z계), 2% glucose 배지에서 배양했을 때의 에탄올 생산량을 검토한 결과(Fig. 5), *Z. mobilis* 세포 농도의 증가에 따라 에탄올 생산 속도는 각각 0.615, 0.856, 0.861g/L·h로 되어 세포 농도가 높아짐에 따라 빨라지는 것으로 관찰되었다.

*Z. mobilis*의 세포 농도를 0.5와 1.0g cell/L-gel로 고정화했을 경우는 에탄올 생산 속도 및 glucose 소비 속도의 변화는 거의 없었으나, 0.25와 0.5g cell/L-gel 고정화했을 경우는 후자가 전자 보다 에탄올 생산 속도가 약 1.5배 증가했으며, glucose의 소비는 3조건 모두 유도가 보이지 않고 직접적으로 에탄올이 생산되었다.

A. awamori(1.25×10^8 spore/L-gel) 및 *Z. mobilis* (0.5g

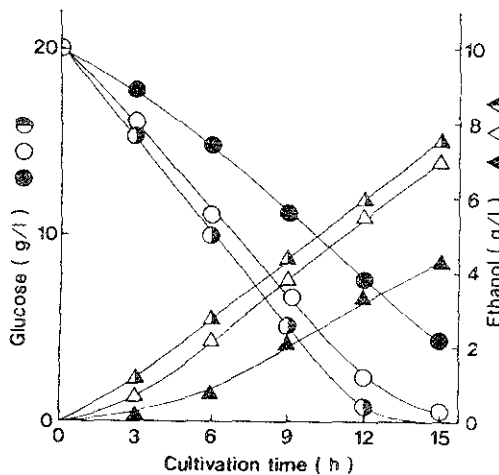


Fig. 5. Effect of initial cell concentration on ethanol production from glucose by immobilized *Zymomonas mobilis*. Closed symbols : 0.25g-cell/L-gel, half open symbols : 1.0g-cell/L-gel, open symbols : 0.50g-cell/L-gel.

cell/L-gel)를 단독 고정화하여, 각각의 배양 48시간째와 15시간째 gel bead상의 균주 분포상태를 위상차 현미경으로 관찰한 결과(Fig. 6), *A. awamori*의 균사는 산소가 풍부한 gel bead 표면부에만 생육하고(Fig. 6-a), *Z. mobilis*는 산소가 비교적 부족한 gel bead 중심부를 중심으로 분포하고 있었다(Fig. 6-b).

A-Z계의 혼합고정화

생전분으로 부터 에탄올을 효율적으로 생산할 수 있는 혼합고정화 배양계를 확립하기 위해서, *A. awamori*

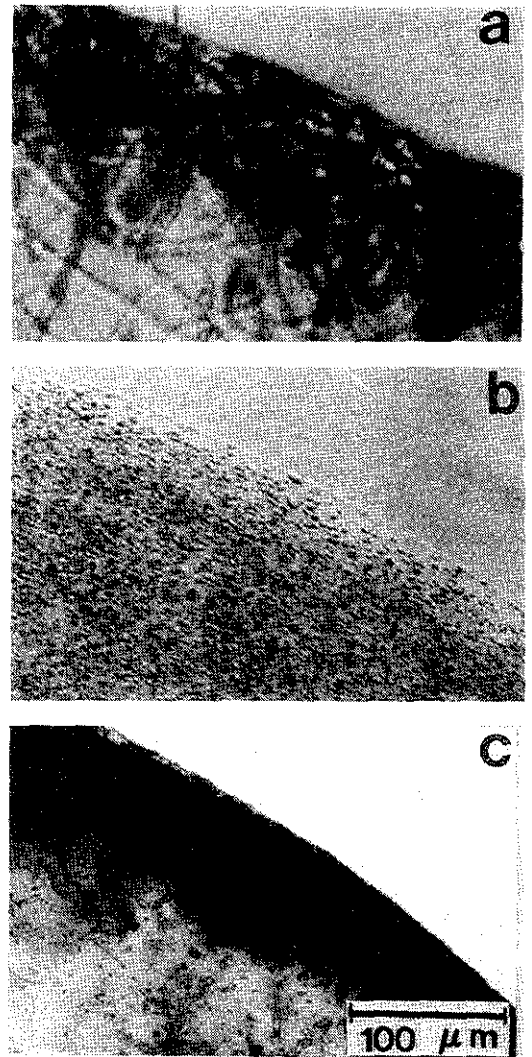


Fig. 6. Microphotographs of cross sections of co-immobilized gel beads.

- a : *Aperigillus awamori*
- b : *Zymomonas mobilis*
- c : A-Z 36 system

(A계)와 *Z. mobilis*(Z계)로 구성된 혼합고정화 배양계(A-Z계라 함)의 혼합비에 대하여 검토하였다. *A. awamori*의 포자수는 단독고정화 배양에서 결정된 최적 포자수인 1.25×10^9 spore/L-gel로 하였고, 이것에 *Z. mobilis*의 세포 농도를 0.25, 0.5 및 1.0g cell/L-gel로 변화시키면서 혼합비가 다른 gel bead를 각각 만들어 2%의 생전분 배지 중에서 220rpm으로 진탕배양을 행한 결과(Fig. 7), 혼합비의 차이에 의해서 생전분의 분해와 에탄올 생산 등에 큰 차이가 나타남을 알 수 있었다.

*Z. mobilis*의 세포 농도를 0.25g cell/L-gel로 했을 때는 *A. awamori*의 활성이 강하여 균사가 gel bead 표면을 덮어 과잉 생육한 결과(Fig. 7-a), 다른 혼합비를 보다 배지 중에 glucose 축적이 많았다. 이러한 결과는 생전분으로부터 생성된 glucose의 대부분이 *A. awamori*의 균증식에 소비되었기 때문에 ethanol 생산량(120시간, 1.85g/L)은 3가지 조건 중에서 가장 낮게 나타난 것으로 추측된다.

*Z. mobilis*의 세포 농도를 1.0g cell/L-gel로 했을 경우(Fig. 7-b), glucose의 축적은 전혀 보이지 않았다. 에탄올 농도는 배양 120시간째에 2.8g/L로 되어 수율($Y_{p/s}$)은 0.16이었으며, pH는 4.4~4.7을 유지하였다. 이러한 결과는 *Z. mobilis*가 생전분으로부터 생긴 glucose를 곧바로 소비하여 gel bead 표면에서의 *A. awamori*의 생육이 불충분하였기 때문에 기질의 분해 속도가 늦어진 결과로 판단된다.

한편 *Z. mobilis*의 세포 농도가 0.5g cell/L-gel로 하였을 경우(Fig. 7-c), 배지 중에 축적되는 glucose량은

미량이었으며, 3가지 조건 중에서 가장 높은 에탄올 생산량인 3.5g/L($Y_{p/s}=0.20$)을 나타내었다(120시간).

이상의 난분해성 생전분 배지로부터 에탄올 생산은 가용성 전분으로부터의 결과와 비교하면(11), 에탄올의 수율이 약 반 정도로 낮았으며, 배양 후기에는 배양액의 pH가 4.0 이하로 떨어지고, 배양시간이 2배로 길어 gel bead로부터 균사가 누출되는 것이 관찰되었다.

*Z. mobilis*의 최적 pH는 5.0~7.0 부근이라고 알려져 있는데(10), 생전분을 기질로 사용했을 때 에탄올 수율이 낮은 것은 배양할 때에 곰팡이 균사가 과잉생육하여 pH가 4.0 이하로 떨어져 *Z. mobilis*의 에탄올 생산성이 저하되었기 때문인 것으로 생각된다. 가용성 전분을 기질로 했을 때의 경우는 배양시에 pH의 저하가 크게 나타나지 않은 점으로 보아(pH 4.7~5.1 유지), 이 현상은 난분해성 기질을 사용했을 때의 특유한 현상으로 고려된다. 또한 gel bead로부터 균사가 누출되는 것은 pH의 저하로 인하여 *Z. mobilis*의 에탄올 생산활성이 저하된 결과, 곰팡이 균체합성에 이용되는 glucose량이 배양액 중에 증가하여 gel bead의 표면부에 곰팡이균사가 과잉 생육하였기 때문으로 추정된다.

이상의 결과로부터 A-Z계의 혼합고정화를 이용하여 생전분으로부터 효율적인 에탄올 생산을 위해서는 ① 기질분해 속도를 촉진시켜 에탄올 수율을 향상시키고, ② 배양액의 pH 저하를 억제시켜 gel bead로부터 균사누출을 방지해야 하며, ③ 산소공급의 시기와 양을 조절해야 할 필요가 있다고 판단된다.

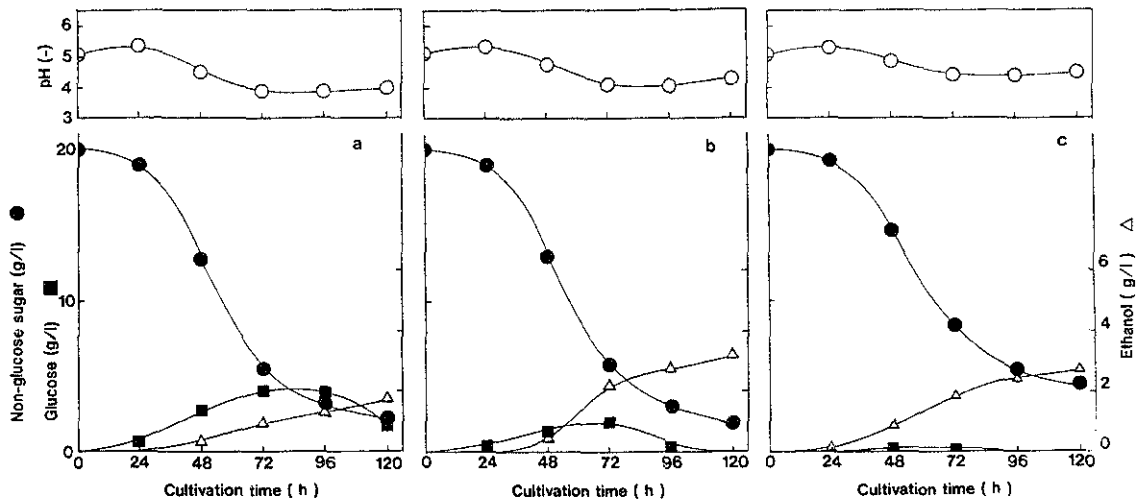


Fig. 7. Ethanol production from raw starch by co-immobilized *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. The initial spore concentration of *Aspergillus awamori* was 1.25×10^9 spore/L-gel while the initial cell concentration of *Zymomonas mobilis* was 0.25(a), 0.50(b) and 1.0(c)g-cell/L-gel.

혼합고정화 배양에 미치는 산소공급의 영향

Gel bead 표면부에 생육하는 *A. awamori*의 균사생육 및 대사는 산소 공급량에 현저하게 영향을 받으므로, 배양 도중에 산소 공급량을 제한함으로써 곰팡이 균사의 과잉생육 방지 및 glucose의 유기산으로 전환이 억제되어, pH의 현저한 저하가 일어나지 않을 것으로 생각된다. 호기적인 배양전기에서는 곰팡이에 의한 amylase의 생산과 당화를 주로 하고, 혐기적인 배양 후기에는 생산된 glucose를 활용하여 알코올 발효가 일어날 것으로 기대된다. 따라서 배양 도중에 배양액의 혐기도를 진탕속도 및 check valve가 부착된 실리콘 plug (Fig. 2)를 이용하여 조절할 때, 이들이 에탄올 생산과 수율에 미치는 영향을 조사하였다.

진탕속도 : 곰팡이 균사의 생육을 억제시키고, 에탄올 생산성을 향상시킬 목적으로 진탕배양할 때 회전수를 ① 80rpm, ② 220rpm, ③ 220rpm→80rpm으로 배양 도중에 전환하거나, ④ 면전 대신에 실리콘 plug를 사용한 4가지의 조건을 검토한 결과 (Table 1), 배양 초기부터 실리콘 plug를 사용한 것을 제외한 나머지 세 가지 경우는 배양 120시간에서 에탄올 생산량, 기질의 소비량 및 pH의 변화 등에서 거의 같은 양상을 보였으나 수율에 있어서는 배양 60시간째에 220rpm→80rpm으로 전환한 것이 일정한 속도로 배양한 것에 비하여 약 1.2배 정도 높았고, gel bead의 균사 누출 현상도 약간 감소되었다. 한편 실리콘 plug를 사용한 경우는 기질의 분해속도가 매우 늦었고 배양 120시간에서 10g/L의 전분이 미분해상태로 검출되었으며, 에탄올 생산량은 기질 분해량에 거의 비례하여 완만한 증가를 나타내었지만, 에탄올 수율($Y_{p/s}$)은 0.36으로 가장 높았다. 이 결과는 배양 초기부터 혐기적 상태가 유지되었기 때문에 전분의 분해 속도가 늦고, 생성된 glucose의 대부분이 *Z. mobilis*에 의해서 이용된 결과로 보이며, 배양 중기 이후부터 삼각플라스크의 내압에 의해 실리콘 plug가 튀어오르는 경우도 있었다.

이상의 결과로부터 A-Z계 혼합고정화 배양계내의 산소공급을 조절함에 의해서 에탄올의 수율을 향상시

킬 수 있다는 가능성을 보였다.

산소유입 차단장치의 이용 : 배양 개시 후 60시간째에 배양기의 면전을 특수 제조한 check valve가 부착된 실리콘 plug로 교환하여 혐기적 배양을 하였을 때 (이하 A-Z 60계)를 호기적 배양(A-Z계)과 비교한 결과 (Fig. 8), 전분의 분해 속도는 대조구(A-Z계)와 거의 같았지만, gel bead 표면으로 곰팡이의 균사 누출은 호기적 배양 보다 상당히 감소되었다.

또한 혐기적 상태로 전환한 시점부터 pH도 4.2 부근으로 유지되었으며, 배양 120시간 까지의 에탄올 생산량은 5.4g/L ($Y_{p/s}=0.30$)로 대조구 ($Y_{p/s}=0.21$) 보다 1.5배가 높아졌다.

이상의 결과로부터 배양 도중 호기적 상태에서 혐기적 상태로 전환함에 의해서 호기배양에서 생긴 pH 저하나 gel bead로부터의 누출이 인정되지 않았고, ethanol 생산량을 향상시키는 것에 성공하였다. 그러나 배

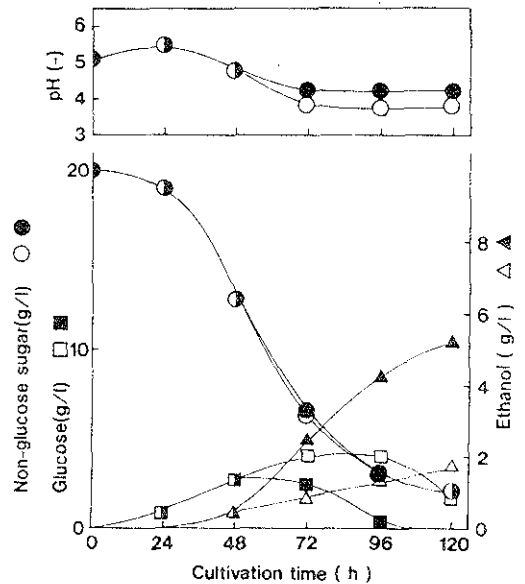


Fig. 8. Ethanol production from raw starch by co-immobilized A-Z and A-Z 60 systems.

Closed symbols : A-Z 60 system, Open symbols : A-Z system.

Table 1. Effects of oxygen supply on the ethanol production from raw starch by A-Z co-immobilized mixed culture system

Oxygen supply		Ethanol (g/L)	Consumption sugar (g/L)	pH	$Y_{p/s}$
Cotton plug	0 rpm	3.25	18.0	4.4	0.18
	220 rpm	3.26	18.2	4.1	0.18
	220→80 rpm	4.05	17.8	4.5	0.22
Silicon plug	220 rpm	3.50	9.8	4.5	0.36

Incubation for ethanol production : temp. 30°C, 220rpm, 120 hours

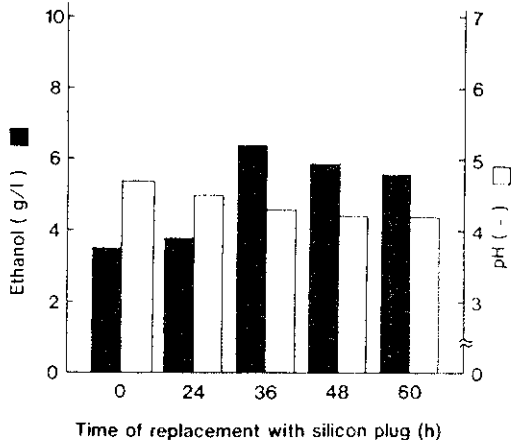


Fig. 9. Effect of transition time from aerobic to anaerobic condition on ethanol production and pH drop in co-immobilized A-Z system.

양 72시간 쯤에 약 1.5g/L의 glucose가 검출된 것으로 보아, 배양전체의 율속단계 (rate-limiting step)는 생전분에서 glucose로 전환하는 당화단계가 아니고, glucose로부터 ethanol이 생산되는 발효단계임을 추측할 수 있었다.

따라서 산소공급 시간이 발효단계에서 *Z. mobilis*의 에탄올 생산성에 미치는 영향에 대하여 배양 0~60시간 까지 배양조건을 호기상태에서 혐기상태로 전환하면서 검토를 행하였으며, 대조구로는 면전을 사용한 호기적 배양계 (A-Z계)를 사용하였다. 각 배양계에 있어서 배양 120시간째의 pH 및 에탄올 생산량을 조사한 결과 (Fig. 9), 배양 0시간 및 24시간째 부터 check valve가 부착된 실리콘 plug로 배양한 것은 *A. awamori*의 생육이 충분하지 못하였기 때문에 기질의 분해 속도는 다른 조건에 비하여 매우 느렸으며 ethanol 생산량도 낮았다. 그러나 36시간째 이후 부터 혐기적인 상태로 배양한 (36, 48, 60시간째) 경우, 기질의 소비경과는 거의 변화가 없었는데 생산된 에탄올 농도는 36, 48, 60시간째의 순으로 산소공급 시간이 길수록 낮아졌고 배지 중의 glucose 축적량도 증대되었다. 이 결과로부터 A-Z계의 최적 배양조건으로서 배양 36시간째 까지는 호기적인 배양을 하고 그 이후는 혐기적인 배양을 행하기로 하였다 (이하 A-Z 36계). 이 최적 조건하에서 A-Z 36계로 배양한 결과 (Fig. 10), 배양조건을 호기적 상태에서 혐기적 상태로 전환한 시점 부터 *Z. mobilis*에 우선적으로 glucose가 사용되어져, 배양액 중에 축적되는 glucose는 거의 잔존하지 않았으며, 배양 120시간째의 에탄올 생산량은 6.4g/L이었고 수율 (Y_{ps})은 0.36으로서 대조구(면전배양) 보다 약 2배 높았다.

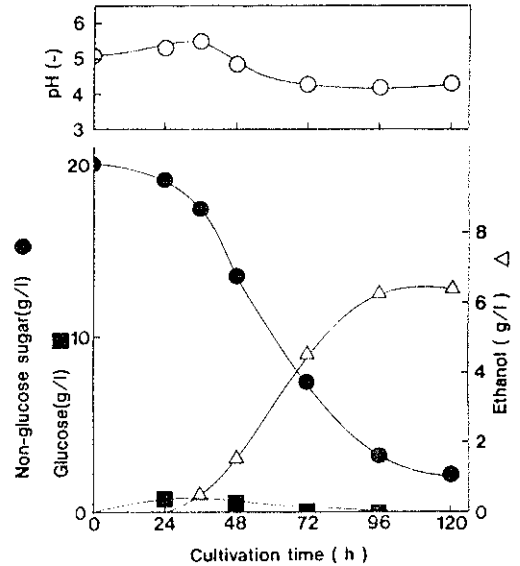


Fig. 10. Raw starch hydrolysis and ethanol production by co-immobilized A-Z 36 system.

A-Z 36계의 배양이 끝난 gel bead 내부의 균주 분포 상태 (Fig. 6-c)를 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 혼합고정화한 gel bead 내에서 산소요구성의 차이로부터 호기성의 *A. awamori*는 산소가 풍부한 gel bead의 표면부(외측의 검은 부분), 혐기성의 *Z. mobilis*는 산소가 적은 gel bead의 중심부(내부의 색이 옅은 부분)에 증식한다는 사실을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 산소요구성이 다른 호기성의 곰팡이와 혐기성의 세균을 혼합고정화함에 의해서 산소공급이 어려운 gel bead의 중심부까지 유효하게 이용할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나 본 연구에서 생산된 에탄올 수율은 전분을 기질로 하였을 경우의 이론수율 (0.51)의 71%에 해당되므로, 좀더 고수율의 에탄올을 얻기 위하여 혼합고정화 system의 개발에 대한 연구가 현재 진행 중에 있다.

요 약

Gel bead의 효율적인 이용을 목적으로 산소요구성이 전혀 다른 두 균주로 구성된 혼합고정화 배양계의 개발을 시도하였다. 호기성 균으로서 *A. awamori*, 혐기성 균으로서 *Z. mobilis*를 사용하여 생전분으로부터 에탄올 생산을 행한 결과는 다음과 같다. 두 균주의 최적 혼합비율은 *A. awamori* 1.25×10^6 spore/L-gel, *Z. mobilis* 0.5g cell/L-gel이었다. 배양이 완료된 후의 gel bead 내의 균주 분포는 각각 혐기부와 호기부, 즉 gel bead의

표면부와 중심부로 생육장소가 구분되어 있었다. A-Z계의 배양에서는 에탄올의 수율이 낮았고, 균사가 gel bead로 부터 누출되었다. 배양 개시 후 36시간째에 배양기의 면전을 특수 제조한 check valve가 부착된 실리콘 plug로 교환하여 혐기적 배양을 행한 A-Z 36계에서는 gel bead로 부터 균사의 누출이 상당히 억제되었고, pH가 4.3을 유지하면서, 에탄올의 수율이 대조구 보다 약 2배 높게 나타났다.

문 헌

- Rose, D. : Yeasts for molasses alcohol. *Process Biochem.*, **11**, 10 (1976)
- Kurosawa, H., Matsumura, M. and Tanaka, H. : Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 926 (1989)
- Shinmyo, A., Kimura, H. and Okada, H. : Physiology of α -amylase production by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 7 (1982)
- Wada, M., Uchida, T., Kato, J. and Chibata, I. : Continuous production of L-isoleucine using immobilized growing *Serratia marcescens* cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1175 (1980)
- Hizukuri, S. : Raw starch digesting activity and kinetic properties of glucoamylase. *J. Jap. Soc. Starch Soc.*, **34**, 98 (1987)
- Gosmann, B. and Rehm, H. J. : Oxygen uptake of microorganisms entrapped in Ca-alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 163 (1986)
- Osuga, J., Mori, A. and Kato, J. : Acetic acid production by immobilized *Acetobacter acti* cells entrapped in a κ -carrageenan gel. *J. Ferment. Technol.*, **62**, 139 (1984)
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- Abdel-Halim, M., El-Sayed, M. and Rehm, H. J. : Morphology of *Penicillium chrysogenum* strains immobilized in calcium alginate beads and in penicillin fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 89 (1988)
- Kurosawa, H., Nomura, N. and Tanaka, H. : Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 716 (1989)
- Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnicki, M. L. and Tribe, D. E. : Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng.*, **23**, 37 (1982)

(1995년 7월 24일 접수)