

## 투과증발을 이용한 섬유성바이오매스의 동시당화 및 추출발효

공 창 범 · † 윤 현 희

경원대학교 화학공학과

(접수 : 1997. 8. 29., 게재승인 : 1997. 10. 24.)

## Simultaneous Saccharification and Pervaporative Fermentation of Cellulosic Biomass

Changbum Kong and Hyon Hee Yoon†

Dept. of Chemical Engineering, Kyungwon University Seongnam, Kyonggi 461-701, Korea

(Received : 1997. 8. 29., Accepted : 1997. 10. 24.)

Application of pervaporative extraction of ethanol to simultaneous saccharification and fermentation(SSF) of cellulose was investigated. From batch experiments, optimum cellulose substrate and enzyme loadings were found to be 10% and 15 IFPU/g cellulose, respectively. The cellulose conversion was lowered in fed-batch system due to the ethanol accumulation. The activity of the yeast *Saccharomyces uvarum* used in this study was significantly reduced at ethanol concentrations above around 40 g/L. From pervaporation experiments using PDMS membrane, ethanol was efficiently separated at 38°C and 10 mmHg of a down stream pressure. The pervaporation unit with 240 cm<sup>2</sup> of surface area was combined into the SSF reactor. The continuous removal of ethanol by pervaporation during SSF resulted in an improved cellulose conversion. Within the scope of this experiment, ethanol yields in the pervaporative SSF and simple SSF were 68.3% and 56.6%, respectively. The permeate flux for SSF broth pervaporation was about one-half that for the pervaporation of aqueous ethanol solution. Accordingly, the development of a membrane with higher ethanol selectivity and flux will increase the feasibility of this technology.

Key Words : ethanol, cellulose, hydrolysis, fermentation, pervaporation

### 서 론

바이오매스자원으로부터 연료용 에탄올을 생산하는 기술의 개발은 깨끗한 대체에너지자원과 새로운 유기화합물자원의 확보라는 관점에서 그 필요성이 강조되고 있다. 에탄올 생산의 원료로 사용될 수 있는 섬유성바이오매스 자원은 농산 및 임산폐기물, 펄프폐액, 폐신문지 및 각종 고체 쓰레기 등으로 이들의 재이용은 환경 및 경제적인 측면에서도 많은 관심이 모아지고 있다. 섬유성 바이오매스로부터 연료용 에탄올을 생산하는 공정은 바이오매스의 주성분인 cellulose를 glucose로 전환시키는 당화공정과 glucose로부터 에탄올을 생산하는 발효공정으로 구성된다. SSF(Simultaneous Saccharification and Fermentation)는 효소가수분해와 미생물발효가 한 개의 반응기에서 이루어지는 것으로 효소가수분해로 생성된 glucose가 미생물에 의하여 즉시 소모되기 때문에 cellulase 효소에 대한 glucose의 저해가 최소화되고 따라서 효소당화속도가 증대된다(1, 2). 현재까지는 이와 같은 SSF가 섬유성바이오매스로부터의 에탄올 생산에 가장 경

제적인 공정으로 보고되고 있다.

SSF공정의 문제점은 cellulase와 yeast의 최적온도가 다르다는 것과 cellulase에 대한 에탄올의 저해작용이다. 일반적으로 cellulase 활성의 최적온도는 50°C 근방이며 yeast에 의한 최적 발효온도는 30°C 근방이다. 따라서 Huang과 Chen(3)은 두 온도사이에서 SSF의 온도를 조업도중 변화시키는 temperature profiling을 제안하였다. 또한 높은 온도(50°C)에서 에탄올 발효가 가능한 thermophilic yeast(4)와 *Zymomonas mobilis*(5) 등의 균주를 사용한 SSF 실험결과도 보고되었다. 그러나 현재 대부분의 SSF는 38°C에서 조업하고 있다. SSF공정에서 에탄올의 저해작용을 줄이고 동시에 정제비용을 절감하기 위해서는 에탄올의 제거가 요구된다. 에탄올 제거방법으로 SSF 반응기에 진공(6)을 가하거나 용매추출(7) 등의 방법이 제안되었다. Mori와 Inaba (8)는 starch를 기질로한 SSF에서 투과증발방법에 의한 에탄올 제거를 통하여 2배이상의 생산성 향상이 가능함을 발표하였다. 현재까지 cellulose를 기질로한 SSF에서 투과증발방법으로 에탄올을 제거한 실험 결과는 발표된 바 없다. 그러나 투과증발에 의한 에탄올 분리는 저에너지 소비형 분리방법이라는 점 때문에 발효액의 분리방법으로 그 사용이 증대되고 있다(9, 10).

이와 더불어 SSF의 생산성을 향상시키기 위해서는 연속공정의 개발이 요구된다. 그러나 연속적인 SSF반응기는 CSTR형태로 조업조건이 공정의 최종단계상태에서 이루어지기 때문에

† Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering, Kyungwon University, Seongnam, Kyonggi, 461-701, Korea  
Tel : 0342-750-5356, Fax : 0342-750-5273  
E-mail : hhyoon@main.kyungwon.ac.kr

SSF반응기 내의 조건이 높은 에탄올농도와 낮은 기질농도를 유지하게 된다. 따라서 에탄올저해와 낮은 기질농도로 인하여 발효속도가 느리다는 단점을 갖고 있다. 이와 같은 문제는 SSF 반응도중 에탄올을 제거하고 fed-batch 형태로 조업함으로써 해결할 수 있을 것이다. 즉, SSF 반응기내의 용액의 유출은 제한하고 기질만 연속적으로 공급함으로써 glucose의 농도를 미생물의 활동에 적절한 상태로 유지할 수 있게 된다. 본 연구에서는 cellulose를 기질로한 SSF공정에서 fed-batch 방식의 조업과 반응도중 에탄올 제거의 효과를 조사하였다. 발효액에서의 에탄올분리는 투과증발방법을 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 효소

균주는 *Saccharomyces uvarum*(KCCM No. 32015)을 사용하였다. 본 균주를 YPD (yeast extract 10, peptone 20, dextrose 20 g/L, pH 5.0)배지 50 mL에 접종하고 38°C, 150 rpm의 조건에서 12 시간동안 배양한 후, 본 배양액 10 mL를 10XYP(yeast extract 100, peptone 200 g/L)배지 10 mL, glucose 용액(500g glucose/L) 10 mL, 멸균증류수 70 mL 에 재접종하여 pH를 5.0으로 조절한 후 38°C, 150 rpm의 조건에서 12시간 동안 2차 배양하여 SSF 실험의 전배양액으로 사용하였다(12).

SSF 실험에 사용한 효소는 Cytolase CL(Environmental Biotechnology, Inc.)이었다. 이 효소의 filter paper activity는 103 FPU/mL,  $\beta$ -G activity는 88.9 pNPGU/mL, 그리고 Endo-G activity는 269 CMCU/mL 이었다.

### SSF 실험

SSF 실험에서 기질은  $\alpha$ -cellulose(93.8% glucan)와 전처리된 바이오매스를 사용하였다. SSF배지의 조성은 일정량의 기질, 10XYP 배지 10%, 전배양액 10%이며 가수분해효소는 기질주입량에 따라 적절히 첨가하였으며 38°C, pH 5.0, 100 rpm의 조건에서 SSF실험을 수행하였다. 본 SSF실험은 250 mL-삼각플라스크(용액부피 100 mL)와 1000 mL 용량의 발효조(용액부피 800 mL)에서 수행하였으며 발효조를 사용한 경우 발효액의 pH를 5N NaOH로 조절하였다.

### Pervaporation 실험

본 실험에 사용한 ethanol 분리용 투과증발막은 flat sheet 형태의 PERVAP 1170(Deutsche Carbone/GFT, based on PDMS silicone)이었다. 막모듈은 plate and frame 형태로 제작하였다. 가로 4 cm, 세로 30 cm, 두께 1 cm의 frame 양쪽면에 막을 설치하였다. 모듈내의 부피는 120 cm<sup>3</sup> 이며 막의 유효면적은 240 cm<sup>2</sup> 이었다. 투과증발실험은 일정농도의 에탄올수용액을 모듈내측으로 순환시키고 모듈의 막외측은 진공(10-30 torr)을 유지시켰다. 투과증기는 액체질소 trap을 이용하여 응축시켰다.

### Pervaporative SSF 실험

실험장치는 Figure 1에 표시한 바와 같이 1 L 용량의 발효장치와 투과증발장치로 구성되었다. 일정시간의 SSF 진행 후 SSF 용액을 투과증발장치로 순환시켜 투과증발을 병행하였다. 투과증

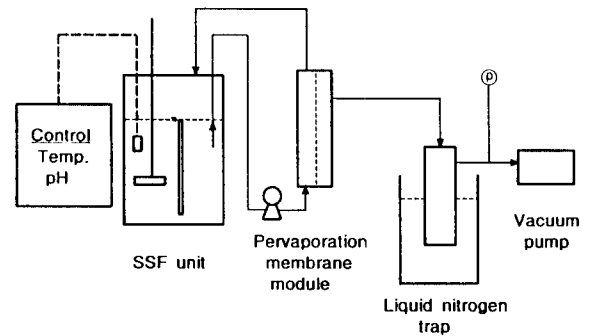


Figure 1. Schematic diagram of the pervaporative SSF apparatus.

의 압력은 10 torr 이었고 투과증기는 액체질소 trap을 이용하여 응축시켰다. 응축된 액체의 질량과 에탄올분석을 수행하였다. Fed-batch 형태의 조업시 24시간 간격으로 일정량의 기질과 효소를 발효조에 첨가하였다.

### 분석

발효액의 당성분(glucose, cellobiose)은 HPLC로 분석하였다. 사용한 column은 AMINEX HPX-87C/87P(BIO-RAD)이고 이동상은 0.005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 이었다. 에탄올은 GC로 분석하였다. GC column은 Carboxen 101(Supelco) 이고 detector는 FID를 사용하였다. Internal standard로 n-propanol을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### SSF 공정

SSF 공정에서 cellulose loading과 enzyme loading의 영향을 조사하고 fed-batch SSF의 효과를 관찰하였다.

**Cellulose loading의 영향** : 회분식 SSF에서 최종 에탄올의 농도는 기질의 주입량에 따라 결정된다. 그러므로 높은 에탄올 농도를 얻기 위해서는 높은 기질의 사용량이 요구된다. 그러나 에탄올의 농도가 어느 이상 높아지면 에탄올에 의한 저해작용으로 인하여 에탄올 수율이 급격히 저하된다. 본 연구에서는 적절한 기질의 사용량을 조사하기 위하여 cellulose의 농도가 각각 5, 10, 20%에서 회분식 SSF실험을 수행하였다. Figure 2는 반응시간에 따라 생성된 에탄올의 농도를 나타낸 것이며 Table 1은 최종 에탄올 농도로부터 계산된 에탄올수율을 표시한 것이다. Cellulose농도가 5%에서 10%로 증가시킨 경우 최종에탄올 농도는 17.1에서 34.1 g/l로 에탄올수율은 56.7에서 60.2%로 증가하였다. 그러나 cellulose농도가 20%인 경우 최종 에탄올농도는 39.2 g/l이고 에탄올 수율은 35.0%까지 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 에탄올농도가 약 4%이상에서는 에탄올저해작용이 심각한 것으로 여겨진다. 본 실험에서 cellulose의 농도가 15% 이상일 경우 slurry농도가 높아져 SSF 용액의 교반이 불가능하였다. 따라서 기질농도가 20%인 실험은 플라스크를 이용하여 shaking air bath에서 수행하였다. 이와 같은 실험 결과로부터 회분식 SSF의 경우 기질의 농도가 10% 정도가 적절하며 그 이상의 경우에는 에탄올제거를 병행하여야 할 것이다.

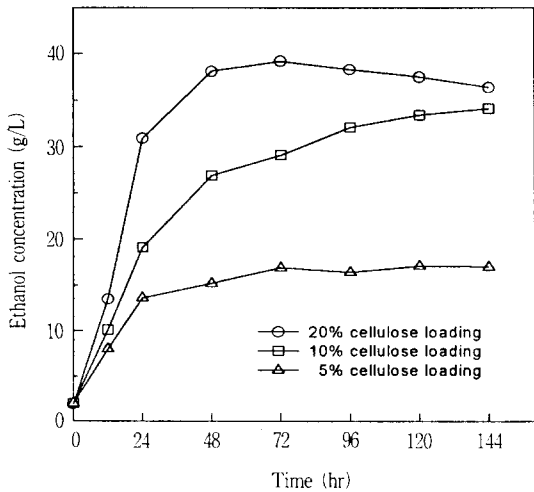


Figure 2. Time course of SSF at different cellulose loadings. SSF conditions: working volume 800 mL (bioreactor), 38°C, pH 5.0, enzyme loading 25 IFPU/g cellulose.

Table 1. Effect of cellulose loading on ethanol yield of in SSF.

Experiment No.	Cellulose loading, %	Ethanol concentration, g/L	Yield
1	5	17.1	56.6
2	10	34.1	60.2
3	20	39.2	35.0

Experiment No. 1, 2 : SSF in bioreactor(800mL working volume)  
 Experiment No. 3 : SSF in flask(100mL working volume)

$$\text{Yield} = \frac{[\text{EtOH}]_f - [\text{EtOH}]_0}{0.568 f [\text{Biomass}]} 100$$

where:

- [EtOH]<sub>f</sub> Ethanol concentration at the end of SSF(g/L)
- [EtOH]<sub>0</sub> Ethanol concentration at the beginning of SSF(g/L)
- [Biomass] Dry biomass concentration(g/L)
- f Cellulose fraction of dry biomass(g/g)

Table 2. Effect of fed-batch operation on ethanol yield in SSF.

Experiment	Ethanol Yield (after 5 days)
Batch SSF with 5% cellulose	56.7
Batch SSF with 10% cellulose	60.2
Fed-batch SSF, initial 5% cellulose and 5% cellulose addition after 24h	58.5
Fed-batch SSF, initial 5% cellulose, 5% cellulose addition after 24h, 5% cellulose addition after 48h, + 5% cellulose addition after 72h	38.6

**Enzyme loading의 영향** : SSF반응에서 효소가수분해속도가 미생물발효보다 느리기 때문에 효소가수분해속도를 결정하는 효소사용량이 에탄올 생산성에 중요한 변수가 된다. Fig. 3은 가수분해효소를 각각 5, 15, 25 IFPU/g cellulose 사용하였을 때의 SSF 실험결과를 나타낸 것이며 효소사용량의 증가에 따라 에탄

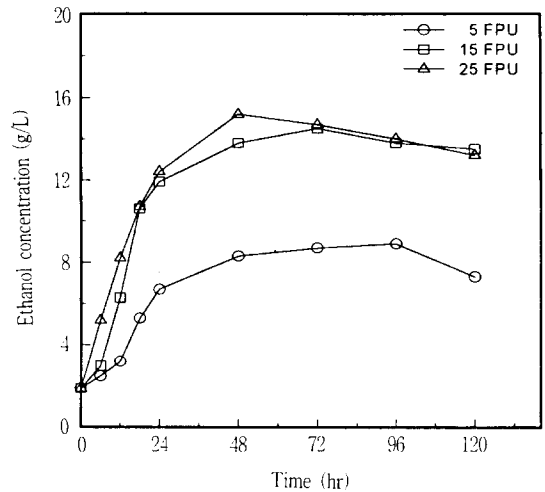


Figure 3. Time course of SSF at different enzyme loadings. SSF conditions: working volume 100 mL(flask), 38°C, pH 5.0.

올 생성이 증가함을 보여주고 있다. 본 실험은 250mL-삼각플라스크에서 SSF 용액 100 mL, cellulose 5%, 38°C, 초기 pH 5.0 150 rpm의 조건에서 수행한 것이다. 가수분해효소 사용량이 5 IFPU/g cellulose일 때 에탄올 생성량이 가장 낮았다. 그러나 가수분해효소 사용량이 15 IFPU/g cellulose인 경우에는 25 IFPU/g cellulose인 경우와 비교하여 초기의 에탄올 생성속도는 낮았지만 최종 에탄올 생성량은 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 이와 같은 실험결과로부터 가수분해효소가 고가인 점을 고려하면 회분식 SSF에서 가수분해효소의 사용량은 15 IFPU/g cellulose 정도가 적절한 것으로 판단된다. 위의 실험에서 SSF 반응시간 2-3일 경과후 에탄올농도가 감소하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 glucose가 고갈되면서 미생물이 생성된 에탄올을 탄소원으로 소모하기 때문인 것으로 여겨진다. 이러한 현상은 Philippidis와 Smith[11]에 의하여 발표된 바 있다.

**Fed-batch SSF** : Fed-batch SSF의 효과를 조사하기 위하여 초기 cellulose 농도를 5%에서 시작하여 24시간마다 5%의 cellulose를 첨가한 SSF 실험을 수행하였다. Fig. 4는 반응시간에 따라 생성된 에탄올의 농도를 표시한 것이다. Fig. 4의 fed-batch 실험에서 실험시작 후 건조상태의 cellulose를 121°C에서 20분간 멸균하여 주입하였다. 이때 cellulose와 함께 25 IFPU/g cellulose의 가수분해효소를 함께 주입하였다. Fig.4의 실험결과로부터 에탄올 수율을 계산하면 38.6%이었다. 본 실험에서 건조상태의 cellulose를 주입하였기 때문에 세 번째의 cellulose를 주입한 후(누적 cellulose 주입량 20%)에는 slurry 농도가 높아져 원활한 교반이 이루어지지 않았다. Table 2에 fed-batch SSF 실험의 에탄올 수율과 단순 batch SSF 실험의 에탄올 수율을 비교하였다. Table 2는 cellulose농도를 5%와 10%로한 batch SSF 실험의 에탄올수율과 5%씩 두 번으로 나누어 주입한 fed-batch SSF 실험의 에탄올수율 나타낸 것이다. Table 2의 자료에서 10% cellulose의 batch SSF와 초기에 5% cellulose로 시작하고 24시간 후 다시 5%의 cellulose를 주입하여 fed-batch SSF를 비교하면 에탄올수율이 각각 60.2%와 58.5%이었다. 따라서 본 실험의 결과로부터 fed-batch SSF가 batch SSF에 비하여 유리하지 않다고 할 수 있다. 또한 본 실험에서 사용한 균주(*Saccharomyces uvarum*)는 에탄올 농도가 40g/L 이상에서

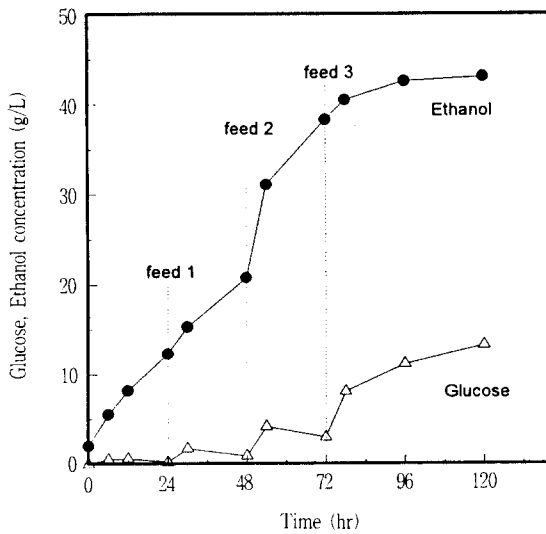


Figure 4. Time course of fed-batch SSF. SSF conditions: working volume 800 mL (bioreactor), 38°C, pH 5.0 initial loading: cellulose 5%, enzyme 25 IFPU/g cellulose fed-batch loading : cellulose(dry) 5%, enzyme 25 IFPU/g cellulose

활성이 크게 저하됨을 관찰하였다. Figure 4에 표시된 바와 같이 SSF 용액의 에탄올농도가 38.3g/L이 된 후부터는 용액의 cellulose 가수분해에 의한 glucose 농도가 증가하였으나 에탄올의 농도는 크게 증가하지 않고 있다. 따라서 효과적인 SSF를 위해서는 SSF 용액에서 에탄올을 분리시키는 공정이 요구됨을 알 수 있다.

**투과증발 실험**

투과증발(pervaporarion)은 비다공성막(pore free membrane)을 이용하여 용액중의 각 성분을 분리하는 것이다. 각 성분의 막물질에 대한 친화력(용해도)과 막내에서의 확산속도 차이에 의하여 막을 통과하는 속도가 다르게된다. 막을 통하여 각 성분을 이동시키는 원동력(driving force)은 막 양쪽의 chemical potential 즉 fugacity 차이이다. 따라서 투과증발의 분리성능은 이와 같은 열역학적 성질에 의존하기 때문에 온도, 압력, 각 성분의 농도 등이 중요한 인자가 된다. 그러므로 본 실험에서 에탄올 수용액을 이용하여 온도, 진공도, 에탄올농도 등에 따른 투과량(total flux)과 에탄올 선택도(selectivity)를 관찰하였다.

Figure 5에 온도변화에 따라 투과량과 선택도의 변화를 표시하였다. 에탄올농도는 10 g/L 진공압력은 10 mmHg이었다. 온도증가(20-60°C)에 따라 투과량이 증가하였고 선택도는 대체적으로 증가하였으나 40°C에서 local optimum 현상을 관찰하였다. 일반적인 투과증발에서는 온도에 따라 투과량은 증가하나 선택도가 감소하는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서는 상반된 현상을 관찰하였다. 본 실험의 범위에서 투과량은 0.074-0.55 kg/m<sup>2</sup>h 이었으며 선택도는 2.5-3.9 이었다. 에탄올 선택도는 원료액의 에탄올농도에 대한 투과응축액의 에탄올농도비로 계산하였다. 이와 같은 실험결과로부터 SSF의 반응온도 38°C를 pervaporative SSF에서의 투과증발 온도로 선정하였다. 투과증발모듈내의 온도를 38°C로 조절하고 진공압력을 10, 20, 30 mmHg로 하였을 때 1.0% 에탄올 수용액으로부터 투과증발된 양은 각각 0.15, 0.10,

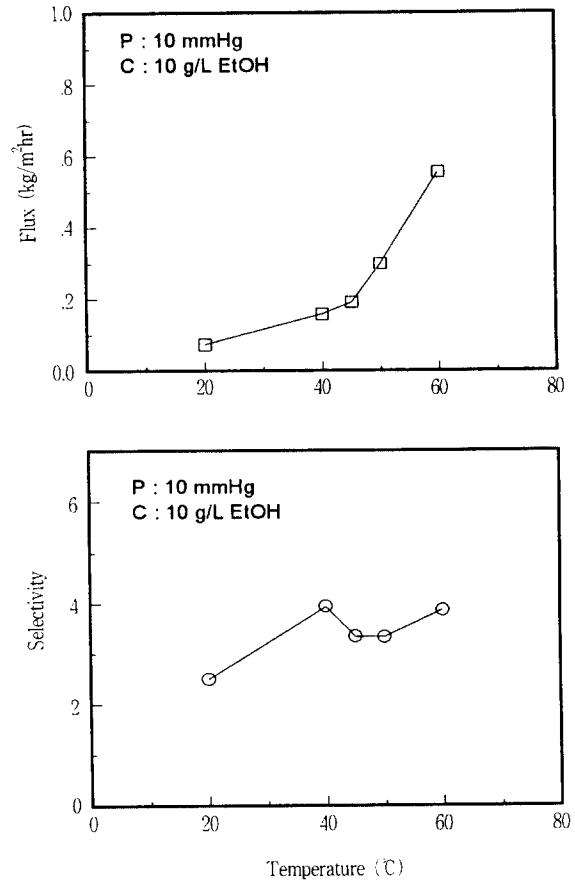


Figure 5. Effect of temperature on total flux and ethanol selectivity of the flat sheet membrane pervaporation of 240 cm<sup>2</sup>. 1 L of 1.0 % aqueous ethanol solution was circulated over the upstream side of the membrane, and a vacuum of 10 mmHg was maintained at the downstream side of the membrane.

0.067 kg/m<sup>2</sup>h 이었고 선택도는 각각 3.1, 3.6, 4.2이었다. 본 실험 결과로부터 에탄올제거량을 근거로 pervaporative SSF의 투과증발 조건을 온도 38°C 진공압력 10 mmHg로 선정하였다.

**Pervaporative SSF 실험**

Figure 6에 투과증발 방법으로 에탄올을 제거하면서 SSF 실험을 수행한 결과를 나타내었다. SSF의 조건은 5% cellulose, 38°C, pH 5.0이었으며 SSF 실험 시작 24시간 후 SSF 용액을 0.5 L/min의 유속으로 투과증발모듈로 순환시켰다. 38°C의 SSF 용액을 투과증발모듈로 순환시킨 결과 모듈내의 온도가 37°C로 유지되었다. 따라서 별도의 온도조절을 하지않고 투과증발을 수행하였다. 투과증발의 진공압력은 10 mmHg로 조절하였다. Pervaporative SSF의 효과를 조사하기 위하여 Figure 6에 같은 조건에서 수행한 단순 SSF 실험결과를 비교하였다. 또한 Figure 6에 투과증발에 의하여 분리 응축된 에탄올의 양을 남아있는 SSF 용액의 에탄올농도에 합하여 표시함으로써 pervaporative SSF공정에서 실제 생성된 에탄올의 양을 나타내었다. Figure 6에 나타난 바와 같이 SSF 도중 에탄올을 제거할 경우 SSF의 에탄올 생산량이 증대됨을 알 수 있다. Figure 6의 결과로부터 에탄올

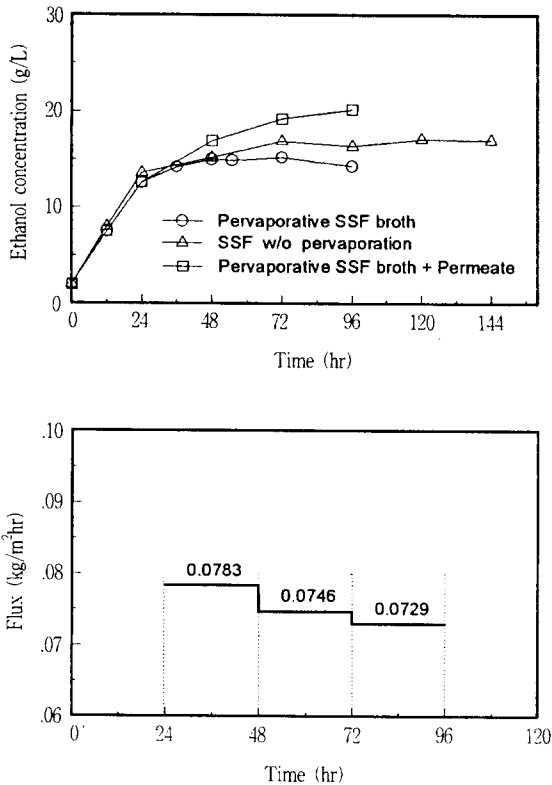


Figure 6. Time course of pervaporative SSF. SSF conditions: working volume 800 mL (bioreactor), 38°C, pH 5.0, cellulose 5%, enzyme 25 IFPU/g cellulose. Pervaporation condition: membrane area 240 cm<sup>2</sup>, SSF broth was circulated over the upstream side of the membrane, and a vacuum of 10 mmHg was maintained at the downstream side of the membrane.

수율을 계산하면 단순 SSF의 경우 56.7%이고 pervaporative SSF의 에탄올 수율은 68.3% 이었다.

SSF용액의 투과증발에서 순수한 에탄올수용액의 경우에 비하여 선택도는 비슷하였으나 flux가 약 1/2 정도로 감소되는 것을 관찰하였다. Figure 6에 표시된 바와 같이 flux가 0.073-0.078 kg/m<sup>2</sup>hr (1.75-1.88 g/hr) 이었다. 이것은 SSF 용액의 cellulose나 미생물에 의한 막의 fouling 또는 농도분극현상에 의한 것으로 여겨진다. 따라서 향후 보다 장시간의 SSF용액의 투과증발실험이 필요하다고 판단된다. 본 실험의 결과 SSF 공정에서 투과증발을 이용하여 에탄올을 제거할 경우 에탄올 수율을 증대시킬 수 있음을 관찰하였다. 그러나 SSF공정에서 투과증발에 의한 효과적인 에탄올분리를 위해서는 높은 에탄올 선택도와 투과도를 장시간 유지할 수 있는 분리막 및 모듈의 개발이 필요할 것이다. 또한 투과증발막의 fouling을 최소화하기 위하여 투과증발의 전단계로 여과공정등의 첨부가 고려될 수 있을 것이다.

## 요 약

섬유성바이오매스로부터 에탄올을 생산하는 동시당화 및 발효 (SSF) 공정의 생산성 향상을 위하여 fed-batch 조업과 SSF조업도중 투과증발을 이용한 에탄올 제거의 영향을 조사하였다.

연구의 첫 단계로 회분식 SSF 공정에서 기질의 주입량과 효소사용량의 영향을 조사하였다. 본 실험의 범위에서 적절한 바이오매스기질의 주입량은 10%이었고 효소사용량은 15 IFPU/g cellulose 이었다. Fed-batch 방식에 의한 SSF 조업시 에탄올 축적으로 인하여 저해작용이 나타나고 그로 인하여 에탄올 생산성이 낮아졌다. 본 실험에서 사용한 에탄올생산 균주(*Saccharomyces uvarum*)는 약 40g/L의 에탄올농도에서 활성이 크게 저하되었다.

SSF에서 생산성을 높이고 고농도의 에탄올을 생산하기 위해서 SSF 도중 생성되는 에탄올을 투과증발을 이용하여 분리하였다. PDMS membrane을 이용한 투과증발실험결과 38°C와 10 mmHg의 막하부 압력에서 에탄올분리가 효과적으로 이루어졌다. 막면적 240 cm<sup>2</sup>인 투과증발장치를 SSF 반응장치와 연결하여 SSF 도중 에탄올을 제거한 결과 에탄올 수율이 향상되었다. 단순 SSF의 경우 에탄올 수율이 56.7% 이었고 pervaporative SSF의 에탄올수율은 68.3% 이었다. SSF용액의 투과증발에서 순수한 에탄올수용액의 경우에 비하여 선택도는 비슷하였으나 투과도가 약 1/2 정도로 감소되는 것을 관찰하였다. 따라서 높은 에탄올 선택도와 투과도 및 내구성을 갖는 투과증발막을 사용하면 SSF공정에서 에탄올의 생산성을 현저히 높일 수 있을 것으로 판단된다.

## 감 사

본 연구는 한국과학재단지원 핵심전문연구(과제번호 951-1104-016-2)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Takaki, M., S. Abe, S. Suzuki, G. H. Emert, and N. Yata (1978), A Method for Production of Alcohol Directly from Cellulose Using Cellulase and Yeast, Proc. Bioconversion Symp.(T. K. Ghose ed.), pp.551-571, IIT Deli, India.
2. Spindler, D. D., C. E. Wyman, and K. Grohmann (1991), Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Wheat Straw to Ethanol with Selected Yeast Strains and  $\beta$ -Glucosidase Supplementation, *Appl. Biochem. Biotech.*, **28/29**, 773-786.
3. Huang, S. Y. and J. C. Chen (1988), Ethanol Production in Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose with Temperature Profiling, *J. Ferment. Technol.*, **66**, 509-516.
4. Blotkamp, P. J., M. Takaki, M. S. Pemberton, and G. H. Emert (1978), Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Simultaneous Fermentation to Alcohol, *AIChE Symp. Ser.*, **74**, 85-90.
5. Lee, K. J., M. L. Skotnicki, D. E. Tribe, and P. L. Rogers, The Effect of Temperature on the Kinetics of Ethanol Production by Strains of *Zymomonas Mobilis*, *Biotechnol. Lett.*, **3**, 291-296.
6. Ghose, T. K., P. K. Roychoudhury, and P. Ghosh (1984), Simultaneous Saccharification and Fermentation of

- Lignocellulosics to Ethanol Under Vacuum Cycling and Step Feeding, *Biotech Bioeng.*, **26**, 377-381.
7. Moritz, J. W. and S. J. B. Duff (1996), Simultaneous Saccharification and Extractive Fermentation of Cellulosic Substrates, *Biotech Bioeng.*, **49**, 504-511.
  8. Mori, Y. and T. Inaba (1990), Ethanol Production from Starch in a Pervaporation Membrane Bioreactor Using *Clostridium Thermosulfuricum*, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 849-853.
  9. Shabtai, Y., S. Chaimovitz, A. Freeman, and E. Katchalski-Katzir (1991), Continuous Ethanol Production by Immobilized Yeast Reactor Coupled with Membrane Pervaporation Unit, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 869-876.
  10. Hickery, P. J. and C. S. Slater (1990), The Selective Recovery of Alcohols from Fermentation Broths by Pervaporation, *Separation and Purification Methods*, **19**(1), 93-115.
  11. Philippidis, G. P. and T. K. Smith (1995), *Appl. Biochem. Biotech.*, **51/52**, 117-124.