

글리세롤 기반의 바이오에탄올 생산을 위한 연속생산반응기의 성능 비교

이상준, 송윤석, 김성봉, 강성우, 한성옥¹, 박철환^{2*}, 김승욱*

Performance Comparison of Continuous Reactors for Bioethanol Production Based on Glycerol

Sang Jun Lee, Yoon Seok Song, Sung Bong Kim, Sung Woo Kang, Sung Ok Han¹, Chulhwan Park^{2*}, and Seung Wook Kim*

접수: 2011년 7월 6일 / 게재승인: 2011년 8월 8일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Ethanol production using glycerol as a carbon source was performed by *Enterobacter aerogenes* immobilized on calcium alginate beads. To improve the ethanol production, the optimal conditions such as loading amount of immobilized cells and glycerol concentration were investigated. The optimal loading amount of immobilized cells and glycerol concentration were 10 mL of calcium alginate bead and 10 g/L, respectively. Consequently, glycerol consumption rate, ethanol concentration and yield were 0.32 g/L·h, 3.38 g/L and 0.43 g/g on the batch production, respectively. Continuous production of ethanol was successfully achieved using two types of immobilized cell reactors (continuous stirred tank reactor and packed bed reactor) from 10 g/L of glycerol. In the continuous stirred tank reactor, glycerol consumption, ethanol concentration, specific productivity and yield were 9.8 g, 4.67 g/L, 1.17 g/L·h, 0.48 g/g,

respectively. The concentration of produced ethanol was 38-44% higher comparison to batch fermentation, and continuous stirred tank reactor showed better performance than packed bed reactor.

Keywords: Immobilization, *Enterobacter aerogenes*, ethanol, glycerol, continuous production

1. 서론

화석연료의 고갈과 지구온난화 및 환경오염 등의 문제들로 인하여 세계 각국은 새로운 에너지원 개발에 많은 노력을 기울이고 있다 [1]. 이러한 상황에서 바이오에너지 (bioenergy)는 급등하는 유가로 인한 경제문제와 화석연료의 사용으로부터 발생하는 환경문제를 줄일 수 있는 대안으로 대두되고 있다 [2].

바이오에너지 중에서 식물성 유지와 알콜 (alcohol)의 에스테르화 (esterification) 반응으로부터 얻어지는 바이오디젤은 화석연료와 비교하여 상대적으로 적은 양의 이산화탄소를 배출하기 때문에 대체 연료로써 생산이 지속적으로 증가하고 있다. 이와 더불어, 바이오디젤 생산의 부산물인 글리세롤 (glycerol) 역시 그 생산량이 증가하고 있으며, 가격이 급격히 하락하고 있는 추세이다 [3]. 바이오에탄올 (bioethanol)은 이산화탄소 저감과 저장 및 이동의 이점 때문에 대체 연료로써 전 세계적으로 연구 및 생산이 활발히 진행되고 있다 [4]. 현재, 바이오에탄올에 대한 연구는 목질계 바이오매스 (biomass)를 원료로 이용하여 에탄올을 생산하는 연구가

고려대학교 화학생명공학과
Department of Chemical Biological Engineering, Korea University,
Seoul 136-701, Korea
Tel: +82-2-3290-3300, Fax: +82-2-926-6102
e-mail: kimsu@korea.ac.kr (S.W. Kim)

¹고려대학교 생명과학부
¹School of Life Science and Biotechnology, Korea University,
Seoul 136-701, Korea

²광운대학교 화학공학과
²Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University,
Seoul 139-701, Korea
Tel: +82-2-940-5173, Fax: +82-2-912-5173
e-mail: chpark@kw.ac.kr (C. Park)

주를 이루고 있다. 이는 다양하고, 풍부한 원료를 이용할 수 있다는 장점이 있지만, 미생물에 의한 발효를 통하여 에탄올을 생산하기 위해서는 바이오매스를 당 단위체로 분해하는 전처리 공정을 거쳐야 한다는 단점이 있다 [5,6].

글리세롤은 미생물들에 의하여 탄소원으로 이용되어 1,3-프로판다올 (1,3-propanediol), 숙신산 (succinic acid), 디하이드록시아세톤 (dihydroxyacetone), 에탄올 등의 물질로 전환될 수 있다 [7]. *Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Lactobacillus reuteri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* 그리고 *Enterobacter aerogenes* 등의 미생물들은 혐기조건에서 글리세롤을 탄소원으로 이용하여 다양한 물질로 전환시킬 수 있다. 이 중, *E. aerogenes*는 추가적인 탄소원 없이 글리세롤만을 탄소원으로 이용하여 에탄올 생산이 가능하다는 장점을 가지고 있다 [8-12]. 이처럼, 낮은 가격과 바이오매스의 당화와 같은 전처리 공정을 필요로 하지 않는 글리세롤을 탄소원으로 이용한 *E. aerogenes*에 의한 바이오에탄올 생산 연구는 중요한 가치를 지니고 있다.

본 연구에서는 *E. aerogenes*의 칼슘알지네이트 (calcium alginate)를 이용한 고정화, 고정화 세포량과 글리세롤 농도가 에탄올 생산에 미치는 영향 및 두 종류의 연속생산반응기 (연속교반탱크반응기 (continuous stirred tank reactor, CSTR), 충전탑반응기 (packed-bed reactor, PBR))의 성능을 비교·평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양조건

통성혐기성균인 *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007를 바이오에탄올 생산을 위한 균주로 사용하였다. 종균배양 (seed culture)은 영양배지 (nutrient broth)에서 37°C, 150 rpm으로 24시간 동안 수행되었고, 에탄올 발효 (fermentation)는 125 mL serum bottle에 50 mL의 배지와 고정화 세포를 첨가하여 37°C, 150 rpm으로 24시간 동안 수행하였다. 이 때, 에탄올 발효를 위한 배지의 조성은 증류수 1 L 당 탄소원으로써 글리세롤, 5 g/L peptone, 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.2 g/L MgSO₄, 1 g/L trisodium citrate dehydrate였다.

2.2. 세포고정화

세포고정화는 소듐알지네이트 (sodium alginate)를 이용한 포괄법을 이용하였다. 종균배양을 거친 *E. aerogenes*는 8,000 rpm에서 25분간 원심분리에 의하여 회수된 후, 2% 소듐알지네이트 용액과 혼합되었다. 이 혼합액을 0.1 M CaCl₂ 용액에 떨어뜨려 구형의 고정화 세포를 제조하였다. 제조된 고정화 세포는 이의 강도를 향상시키기 위하여 4°C에서 24시간 보관되었으며, 멸균수로 세척된 후에 에탄올 발효를 위하여 사용되었다.

2.3. 글리세롤과 에탄올 농도 측정

에탄올 및 글리세롤의 농도는 Refractive Index Detector (RID-

10A, Shimadzu, Japan)가 탑재된 high performance liquid chromatograph (HPLC)를 이용하였고, 컬럼 (column)은 Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하였다. 이때, 컬럼의 온도는 55°C, 이동상 (mobile phase)은 5 mmol H₂SO₄를 사용하였으며, 유속은 0.8 mL/min이었다.

2.4. 고정화 세포의 건조중량 측정

균체와 소듐알지네이트가 혼합된 10 mL의 혼합물을 고정화 세포로 제조한 후, 45°C에서 12시간 동안 건조하여 무게를 측정하였다. 고정화 세포의 단위무게 당 세포의 수는 1 g의 고정화 세포를 1.0 M의 인산화칼륨용액에 용해시켜 영양한천배지에 도말한 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하여 측정하였다. 제조된 고정화 세포의 건조중량은 0.05 g/mL (균체와 칼슘알지네이트 혼합물)이었으며, 고정화 세포의 단위무게 당 고정화된 세포의 수는 약 5 × 10⁹ cells/g이었다.

2.5. 고정화 세포 반응기

에탄올의 연속생산을 위해서 500 mL 부피의 연속교반탱크 반응기 (continuous stirred tank reactor, CSTR)와 충전탑반응기 (packed-bed reactor, PBR)를 제작하였다 (Fig. 1). 각 반응기 내부의 온도는 물의 순환에 의하여 37°C로 일정하게 유지시켰으며, 액체이송펌프 (peristaltic pump)를 이용하여 희석률 (dilution rate)을 조절하였다.

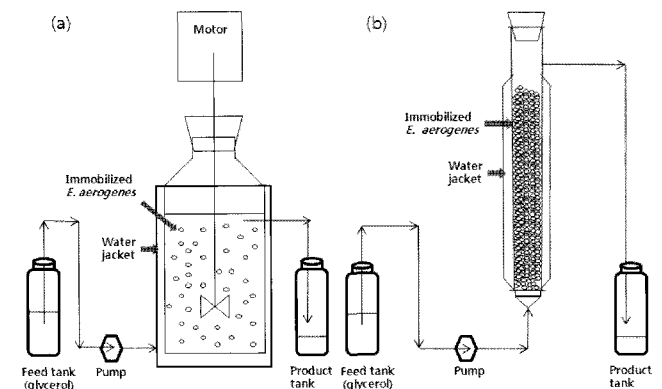


Fig. 1. Schematic diagrams of continuous stirred tank reactor (a) and packed bed reactor (b).

3. 결과 및 고찰

3.1. 희분식 발효에서 초기 고정화 세포량에 따른 에탄올 생산

에탄올 생산에 있어 고정화 세포를 이용하면 세포의 에탄올에 대한 내성이 증가하며, 발효시간을 단축시킬 수 있게 된다. 또한, 에탄올의 분리 정제에 있어서도 세포의 회수가 간편하여 에탄올의 분리 정제의 용이성이 증가할 뿐 아니라 분리와 여과에 필요한 공정의 축소로 비용절감의 효과도 기대할 수 있다 [13,14]. 알지네이트를 이용한 세포고정화는 다른 고정화 방법들에 비하여 고정화 방법의 간편성과 무독성 때문에 실험실 규모에서 산업적 규모까지 가장 널리 이용되

고 있는 세포고정화 방법 중 하나이다 [15]. 본 연구에서는 2% 농도의 소듐알지네이트를 이용하여 *E. aerogenes*를 고정화시켰고, 제조된 고정화 세포의 지름은 약 1.5 mm로 균일하게 제조하였다. 제조된 고정화 세포량에 따른 에탄올 생산량을 비교하기 위해 10 mL에서 50 mL 범위의 칼슘알지네이트 담체의 충전량을 변화시키면서, 다양한 농도의 고정화 세포와 5 g/L의 글리세롤이 포함된 50 mL 회분식 발효에서 에탄올 생산과 글리세롤 소모를 조사하였다. Table 1에 첨가된 고정화 세포량이 글리세롤의 소비와 에탄올 생산에 미치는 영향을 나타내었다. 모든 실험구에서 첨가된 글리세롤은 24시간 동안 모두 소모되었고, 에탄올 생산량 (1.7-1.8 g/L), 수율 (0.34-0.36 g/g) 및 생산성 (0.07-0.08 g/L·h)도 모든 실험구에서 차이를 나타내지 않았다.

그러나 첨가된 고정화 세포의 건조중량 당 에탄올 생산성 (specific productivity)은 첨가된 고정화 세포량이 증가할수록 감소하였다. 0.5 g의 고정화 세포 (10 mL 칼슘알지네이트 담체)가 첨가되었을 때, 가장 높은 비생산성 (3.4 g/L·g)을 나타낸 반면, 2.5 g (50 mL 칼슘알지네이트 담체)이 첨가된 실험구는 가장 낮은 비생산성 (0.72 g/L·g)을 나타내었다. 이러한 결과는 5 g/L의 글리세롤이 포함된 회분식 발효에서 10 mL 이상의 칼슘알지네이트 고정화 세포가 첨가되어도 에탄올 생산은 더 이상 증가하지 않는다는 점과 글리세롤의 농도를 증가시키면 에탄올 생산은 현저히 증가될 수 있다는 것을 의미한다.

Table 1. Effect of the loading amount of immobilized *E. aerogenes* on the ethanol production in batch condition

| Parameters | Loading amount of calcium alginate bead (mL) [*] | | | | |
|-------------------------------|---|------|------|------|------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| Ethanol concentration (g/L) | 1.70 | 1.72 | 1.70 | 1.77 | 1.80 |
| Ethanol yield (Yg/g) | 0.34 | 0.35 | 0.34 | 0.35 | 0.36 |
| Productivity (g/L·h) | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.08 |
| Specific productivity (g/L·g) | 3.40 | 1.72 | 1.13 | 0.89 | 0.72 |

^{*}Weight of calcium alginate bead (1 mL) is about 0.05 g and 3×10^8 cells are immobilized on 1 mL of calcium alginate bead.

3.2. 글리세롤 농도에 따른 에탄올 생산

탄소원인 글리세롤 농도에 따른 에탄올 생산에서의 영향은 5-15 g/L의 글리세롤이 포함된 50 mL 회분식 발효에서 10 mL의 칼슘알지네이트 고정화 세포를 첨가하여 수행하였다. Table 2에서 나타낸 것과 같이, 첨가된 글리세롤 농도가 증가될수록 글리세롤 소모와 에탄올 생산은 증가하였다. 10 g/L의 글리세롤이 포함된 배지에서의 글리세롤 소모속도, 에탄올 생산량, 수율 및 생산성은 각각 7.79 g/L, 0.32 g/L·h, 3.38 g/L, 0.43 g/g 및 0.14 g/L·h로 5 g/L의 글리세롤 배지에서의 값들 보다 모든 면에서 증가했다. 하지만 글리세롤 농도 10 g/L과 15 g/L의 경우, 글리세롤 소모와 에탄올 생산에서 유의성 있는 증가를 나타내지 않았다.

이러한 현상은 탄소 기질 저해영향과 미생물 내, 외부의 삼투압 차이 때문인 것으로 사료된다. 미생물의 생장에 있어 최대 기질 섭취량보다 많은 기질을 공급하게 되면 기질저해

현상이 일어나 미생물의 성장과 생산물의 생성에 저해를 일으키게 된다. 또한 일정 농도 이상의 기질이 배지 내에 존재하게 되면 미생물 내, 외부에 삼투압 차이로 인한 삼투현상이 발생하게 되어 미생물의 탈수현상으로 생장에 저해가 발생하게 된다 [16,17]. 기질 농도에 따른 *E. aerogenes*의 글리세롤 소모와 에탄올 생산은 Jung 등 [18]의 결과와 유사하였다. *E. aerogenes*의 유리세포를 이용하여 에탄올을 생산하였을 때, 글리세롤 농도 10 g/L 이상의 범위에서는 일정시간 발효 후에도 글리세롤의 소모와 에탄올 생산이 오히려 감소하거나 더 이상 증가하지 않았다고 보고하였다. 그 결과, 10 g/L 이상의 글리세롤은 과잉 첨가로 판단되었으며, 위 결과를 바탕으로 10 g/L의 글리세롤이 에탄올 생산을 위한 적절한 농도로 판단되었다.

Zhao 등 [19], Najafpour 등 [20] 그리고 Nikolic 등 [21]은 고정화된 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 글루코스 (glucose) 또는 자일로오스 (xylose)로부터 24시간에 각각 0.38, 0.32 및 0.38 g/g의 에탄올 수율을 얻었다. 글루코스 또는 자일로오스 기반의 에탄올 생산과 비교하여, 본 연구에서 제시한 10 g/L (0.43 g/g) 및 15 g/L (0.48 g/g)의 글리세롤을 이용한 에탄올 생산은 기질의 다양화 측면에 매우 유용한 대안 중 하나라고 할 수 있다. 또한, Jung 등은 바이오디젤 생산 공정으로부터 유래된 글리세롤 (crude 글리세롤)과 순수 글리세롤을 탄소원으로 하여 비교 실험했을 때, crude 글리세롤을 이용하여도 에탄올 생산에 있어 저해현상이 크지 않음을 보고하였다 [18]. 따라서, crude 글리세롤 역시 *E. aerogenes*를 이용한 에탄올 생산에서 효과적인 탄소원으로 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

Table 2. Effect of glycerol concentration on the ethanol production by immobilized *E. aerogenes*

| Parameters | Glycerol concentration (g/L) | | |
|--------------------------------------|------------------------------|------|------|
| | 5 | 10 | 15 |
| Glycerol consumption (g) | 5.00 | 7.79 | 8.19 |
| Consumption rate of glycerol (g/L·h) | 0.21 | 0.32 | 0.34 |
| Ethanol concentration (g/L) | 1.70 | 3.38 | 3.92 |
| Ethanol yield (Yg/g) | 0.34 | 0.43 | 0.48 |
| Productivity (g/L·h) | 0.07 | 0.14 | 0.16 |

3.3. 고정화 세포를 이용한 에탄올의 연속생산

고정화 세포를 이용한 에탄올의 연속생산을 위하여 교반식 반응기 (continuous stirred tank reactor, CSTR)와 충전탑 반응기 (packed-bed reactor, PBR)를 사용하였고, 그 성능을 비교하였다. 교반식반응기 운전의 경우, 위 실험들에서 최적 값으로 도출된 0.01 g/mL 고정화 세포와 10 g/L 글리세롤을 이용하였다. 500 mL 부피의 반응기에 글리세롤이 포함된 400 mL의 생산배지와 100 mL의 칼슘알지네이트 고정화 세포를 첨가하였고, 400 mL의 생산배지가 각각 6, 12 그리고 24시간 마다 새롭게 교환될 수 있도록 희석률을 변화시켰다. 또한, 충전탑반응기 운전의 경우에는 500 mL 부피의 반응기에 글리세롤이 포함된 150 mL의 생산배지와 350 mL의 칼슘알지네이트 고정화 세포를 첨가하였고, 150 mL의 생산배지

가 각각 6, 12 그리고 24시간 마다 새롭게 교환될 수 있도록 희석률을 변화시키며 반응을 진행하였다.

Table 3은 고정화 세포를 이용한 에탄올의 연속생산에서 교반식반응기와 충전탑반응기의 성능을 비교하여 제시하고 있다. 교반식반응기에서는 희석률에 따라 글리세롤 소모와 에탄올 생산이 크게 영향을 받았다. 희석률이 0.03 h⁻¹일 때, 글리세롤 소모량, 에탄올 생산량 및 비생산성은 각각 9.8 g, 4.67 g/L 및 1.17 g/L·g이었고, 0.13 h⁻¹인 경우, 각각 6.15 g, 3.13 g/L 및 0.78 g/L·g이었다. 하지만 0.13 h⁻¹의 희석률에서는 높은 희석률로 인하여 단위시간 당 처리량 (throughput) 과 단위시간 당 생산물 저장조 (product tank)에 축적된 에탄올 양 (accumulated ethanol)은 각각 52 mL/h와 0.163 g/h로 다른 희석률의 실험구와 비교하여 현저히 높은 값을 보였다. 한편, 충전탑반응기에서 희석률에 따른 글리세롤 소모와 에탄올 생산에서의 영향은 교반식반응기보다 미미하였다. 모든 희석률에서 소모된 글리세롤 양과 생산된 에탄올 양은 각각 9.11-9.91 g, 4.70-4.86 g/L로 유사한 결과를 나타내었다. 교반식반응기와 충전탑반응기를 비교하였을 때, 글리세롤 소모량과 에탄올 생산량은 충전탑반응기에서 다소 높은 결과를 나타내었다. 그러나 비생산성과 단위시간 당 처리량 그리고 단위시간 당 생산물 저장조에 축적된 에탄올 양은 연속교반탱크반응기가 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 고정화 세포를 이용한 글리세롤 기반의 에탄올 연속 생산은 교반식반응기가 충전탑반응기에 비해 더 효과적임을 제시하고 있다.

Table 3. Effects of 2 different reactors on the continuous ethanol production

| Reactor | Parameters | | | | |
|-------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|-------------------------------|
| | Dilution rate (h ⁻¹) | Glycerol consumption (g) | Ethanol concentration (g/L) | Ethanol yield (Yg/g) | Specific productivity (g/L·g) |
| ¹ CSTR | 0.13 | 6.15 | 3.13 | 0.51 | 0.78 |
| | 0.07 | 7.84 | 3.52 | 0.45 | 0.88 |
| | 0.03 | 9.80 | 4.67 | 0.48 | 1.17 |
| ² PBR | 0.05 | 9.91 | 4.86 | 0.49 | 0.41 |
| | 0.03 | 9.11 | 4.70 | 0.52 | 0.39 |
| | 0.01 | 9.82 | 4.83 | 0.49 | 0.40 |

¹CSTR: Continuous stirred tank reactor.

²PBR: Packed bed reactor.

4. 결론

본 연구에서는 글리세롤을 탄소원으로 사용하여 고정화된 *E. aerogenes*에 의한 에탄올 생산을 위하여 제조된 고정화 세포의 특성을 조사하였고, 가장 효과적인 고정화 세포량 및 글리세롤 농도를 도출하였으며, 연속식 반응기로서 교반식 반응기와 충전탑반응기의 에탄올 연속생산 성능을 조사하였다. *E. aerogenes*는 칼슘알지네이트에 고정화되어 고정화 세포의 단위무게 당 고정화된 세포의 수가 약 5 × 10⁹ cells/g 인 다공성의 고정화 세포를 제조하였다. 회분식 발효에서

10 mL 칼슘알지네이트 고정화 세포와 10 g/L 글리세롤을 이용하여 에탄올 생산을 수행하였을 때, 글리세롤 소모속도와 에탄올 생산량 그리고 수율은 각각 0.32 g/L·h, 3.38 g/L, 0.43 g/g이었다. 이러한 조건들을 500 mL 부피의 교반식반응기에 도입하였을 때, 0.03 h⁻¹의 희석률에서 소모된 글리세롤 량, 에탄올 생산량, 비생산성 그리고 수율은 각각 9.8 g, 4.67 g/L, 1.17 g/L·g, 0.48 g/g이었다. 이 결과들은 회분식 발효에서의 결과들 보다 현저히 높은 값들이었고, 비생산성과 단위시간 당 처리량 및 산물 저장조에 축적된 에탄올 양을 비교하였을 때, 충전탑반응기보다 더 향상된 성능을 나타내었다.

감사

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업 (032-091-019)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Sabourin-Provost, G. and P. C. Hallenbeck (2009) High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresour. Technol.* 100: 3513-3517.
- Yazdani, S. S. and R. Gonzalez (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotech.* 18: 213-219.
- González-Pajuelo, M., J. C. Andrade, and I. Vasconcelos (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 31: 442-446.
- Franceschina, G., A. Zamboni, F. Bezzo, and A. Bertucco (2008) Ethanol from corn: a technical and economical assessment based on different scenarios. *Chem. Eng. Res. Des.* 86: 488-498.
- Aristidou, A. and M. Penttila (2000) Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 187-198.
- Klinke, H. B., A. B. Thomsen, and B. K. Ahring (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 10-26.
- Mu, Y., H. Teng, D. J. Zhang, W. Wang, and Z. L. Xiu (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.* 28: 1755-1759.
- Biebl, H. (2001) Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 27: 18-26.
- Malaoui, H. and R. Marczak (2001) Separation and characterization of the 1,3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D. *J. Appl. Microbiol.* 90: 1006-1014.
- Barbirato, F. and A. Bories (1997) Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. *Res. Microbiol.* 148: 475-484.

11. Talarico, T. L., L. T. Axelsson, J. Novotny, M. Fiuzat, and W. J. Dobrogosz (1990) Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. *Appl. Environ. Microb.* 56: 943-948.
12. Ito, T., Y. Nakashimada, K. Senba, T. Matsui, and N. Nishio (2005) Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 260-265.
13. Lee, K. H., I. S. Choi, Y. G. Kim, D. J. Yang, and H. J. Bae (2011) Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresour. Technol.* 102: 8191-8198.
14. Kourkoutas, Y., A. Bekatorou, I. M. Banat, R. Marchant, and A. A. Koutinas (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.* 21: 377-397.
15. Idris, A. and W. Suzana (2006) Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochem.* 41: 1117-1123.
16. Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, and D. P. Clark (2009) *Brock biology of microorganisms*. 12th ed., pp. 167-169. Pearson Education, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
17. Ginkel, S. V., S. Sung, and J. J. Lay (2001) Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4726-4730.
18. Jung, H., P. J. Seong, A. R. Go, S. J. Lee, S. W. Kim, S. O. Han, J. Cho, D. H. Cho, Y. H. Kim, and C. Park (2011) Bioethanol production based on crude glycerol using *Enterobacter aerogenes*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 26: 223-228.
19. Zhao, J. and L. Xia (2010) Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochem. Eng. J.* 49: 28-32.
20. Najafpour, G., H. Younesi, and K. Syahidah Ku Ismail (2004) Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 92: 251-260.
21. Nikolic, S., L. Mojovic, D. Pejcin, M. Rakin, and M. Vukasinovic (2010) Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biomass Bioenerg.* 34: 1449-1456.