

고정화 효모를 이용한 에탄올의 연속생산



김 승 욱

<수원대 유전공학과 조교수>

1. 서 론

현재 전 세계적으로 생산되고 있는 공업용 에탄올의 대부분은 회분식 발효에 의해 생산되고 있다. 회분식 발효에서는 세척, 멸균, 충전, 접종, 발효, 발효액 제거등의 작업이 반복하여 진행되며, 이에 따라 조업중단과 개시가 되풀이되므로 자동제어가 곤란하며, 인건비가 비싸게 든다.(1). 이와같은 회분식 발효의 한계성때문에 생산성을 향상시킬 수 있는 연속식 발효와 새로운 발효 시스템이 연구 개발되고 있다. 에탄올의 생산성을 향상시키는 방법중에서 가장 많은 관심을 받고 있는 기술은 고정화균체(Immobilised cell)를 이용한 연속발효법이다(2-4).

고정화 균체란 어떤 공간이나 물체의 부분에 균체를 고정시키고, 그 생물학적 촉매성질을 유지하여, 연속적으로 재사용을 가능하게 하는 균체의 상태를 말한다. 균체의 고정화는 높은 농도의 균체를 작은 공간에 유지시키고 균체유실을 피할 수 있어, 에탄올의 생산성을 크게 증가시킬 수 있다. 또한 오염의 위험이 적고 연속가동이 가능하며 시스템의 제어가 가능하고, 여러 반응기를 서로 연결시켜 사용할 수 있다. 그리고 균체가 고정되어 있기 때문에 발효중의 사고를 쉽게 시정하고 다시 가동시킬 수 있다.

고정화 담체와 고정화 방법을 선정할때는 먼저 담체가 미생물이 원래 갖고있는 발효특성에 영향을 미치지 않아야 하고, 고정화할때 미생물을 사멸시키지 않는 온화한 조건에서 처리하는 것이 중요하다. 균체 고정화를 위해 많은 방법이 시도되었으나, 많은 이용되는 것으로서는 비반응 물질 표면에 균체를 부착시키는 흡착법(Adsorption)과 균체를 물질내에 가두어 두는 포괄법(Entrapment)이 있는데, 포괄법은 다량의 균체를 고정시킬 수 있어 균체의 유실이 많은 흡착법

■ 目 次 ■

1. 서 론
2. 효모의 고정화
3. 실험 재료 및 방법
4. 결과 및 고찰
5. 결 론
6. 참고문헌

보다 널리 쓰인다(3).

일반적으로 포괄법을 위한 고정화 담체로서 Ca-alginate, K-carrageenan, Gelatin, Chitosan, Polyacrylamide gel등을 사용하는데, 이들을 이용하여 고정화의 안정성과 높은 효율성을 얻기 위한 방법이 연구되고 있다(2, 5). 이중에서 에탄올 발효공정에서는 대량으로 손쉽게 구할 수 있고, 고정화 과정이 저렴하고, 장기간 동안 기계적 강도가 우수하며 무독성의 천연 고분자인 Calcium-alginate를 이용한 포괄법이 가장 많이 사용되고 있다(6-8).

현재 에탄올 발효율을 높이기 위해 Alginate gel의 농도 및 강도, 경화액의 농도, 균체의 농도, Bead의 크기에 관한 최적조건이 많이 연구되고 있다(9-11). 또한 Bead에서의 물질전달에 관한 연구도 진행되고 있다(12-14). 특히 Ca-alginate를 사용하는 방법의 주된 단점으로 지적되고 있는 것은 Phosphate와 같은 Calcium-chelating agent의 존재하에 Ca-alginate gel이 쉽게 파괴될 수 있다는 것이다(9). 이 문제는 발효배지내의 Phosphate농도를 가능한한 줄임으로써 해결할 수도 있겠으나, 발효배지내의 Phosphate는 발효균의 정상적인 기능을 유지하는데 필수적인 요소이므로, 다른 방법으로 Phosphate에 안정한 Alginate bead가 개발되어야 한다. 또한 더욱 우수한 고정화 담체가 되기 위해서는 일반적으로 기계적 강도가 우수하며 장기간 사용할 수 있고 많은 세포가 성장할 수 있고 Bead로부터 유출되는 세포의 수가 적어야 함과 동시에 물질전달이 용이하여 세포 생존률이 높고, 에탄올 생산성도 높아야 할 것이다.

본 연구에서는 Ca-alginate의 단점을 보완하고 에탄올 생산을 향상시킬 수 있는 변형된 Ca-alginate gel bead를 개발하고, 효모를 고정화하여 에탄올 연속생산을 시도하였다.

2. 효모의 고정화

1882년에 에탄올의 연속생산을 위해 효모를 기공이 있는 실린더에 고정화한 체계를 처음으로 도입한 사람은 Delbruck이었다. 또한 1899년 Barbet는 효모를 충전물질에 고정화시켰다. 그러나 그 당시에는 반응기설계 및 제작에 대한 기술이 초보적인 단계이었기 때문에 다른 미생물에 의한 오염도가 커서 연속생산에는 실패했으나 높은농도의 균체가 빠른 발효에 필수적이라는 사실을 확인했다(4).

그 후 균체 고정화 방법과 생물반응기 설계 기술이 발전함에 따라 고정화 효모에 의한 에탄올의 연속생산이 가능하게 되었으나, 여전히 많은 연구가 필요하다. 특히 고정화 방법에 있어서 포괄법은 앞에서 언급한 바와 같이 다량의 균체를 고정화시킬 수 있어서 흡착법보다 더 많이 쓰인다. 초기에는 Polyacrylamide를 많이 사용하였으나 고정화 반응조건이 균체를 손상시키는 큰 단점때문에 천연적인 Alginate나 K-carrageenan과 같은 고분자를 많이 사용한다. 그 밖에 agar를 사용한 경우도 있었다. 그러나 산소와 생산물의 확산이 잘 안되는 것이 이 방법의 단점이다(15).

Shiotani와 Yamane(16)은 Ca-alginate gel에 고정화한 효모가 Polyacrylamide gel에 고정화한 효모보다 훨씬 빨리 정상상태에 이른다고 보고하였고, 충전탑 생물반응기에서 에탄올의 생산성을 비교했을때 Ca-alginate gel이 훨씬 우수함을 증명하였다. 일반적으로 Ca-alginate gel과 K-carrageenan gel의 에탄올 생산성은 매우 우수한데, K-carrageenan의 경우 대규모화(Scale-up)할때 문제점이 있어 Ca-alginate gel이 가장 널리 쓰인다.

Ca-alginate gel은 배지내의 Phosphate 성분

때문에 장기간 사용시 gel이 약해져 문제점으로 지적되고 있어 첨가제 및 경화제등을 사용하여 gel의 강도를 높히려는 시도가 여러 연구자들에 의해 보고되었다. Cheetham등(9)은 Ca-alginate gel에 효모를 고정화했을때 우수한 물리적 성질을 가지며, Alginate나 Ca이온의 농도를 감소시켰을때 확산계수는 증가한다고 보고하였다. 그러나 고정화 효모가 세포분열을 할때 효모의 유실이 생기므로 더 강한 bead를 사용하여 효모의 유실을 방지하여야 한다. 따라서 기질에 대해 높은 확산계수를 갖고 효모의 유실을 최소화할 수 있는 강한 bead를 개발하여야 한다. Veliky와 Williams(17)는 Ca-alginate bead를 Polyethyleneimine, Polypropyleneimine hydrobromide와 Polyvinylamine hydrochloride등의 Polycation으로 처리했을때 Phosphate이온에 상당히 강한 Matrix가 형성된다고 보고하였다. 이러한 처리들은 고정화 효모의 호흡 활성도를 상당히 감소시키지만 에탄올의 생산성에는 영향을 미치지 않는다는 결과를 얻었다.

Birnbaum등(18)은 3가지 방법을 사용하여 Ca-alginate bead를 처리하였다. Polyethyleneimine처리후 Glutaraldehyde의 처리, Ester형성을 위한 Carbodiimide와 N-hydroxysuccinimide의 처리후 Polyethyleneimine에 의한 가교처리, Aldehyde group의 형성을 위한 Periodate처리후 Polyethyleneimine에 의한 가교처리등의 3가지 방법을 사용하였다. 이러한 방식으로 안정화된 고정화 효모는 처리하지 않은 고정화 효모와 거의 비슷한 활성도를 유지하였으며, 생존률도 화학처리하는 동안 매우 안정하였다. 그러나 위의 방법중 2, 3번째 방법은 활성도가 높고 Phosphate에 안정하지만 사용되는 화학약품의 값이 비싼 단점이 있다.

그밖에 SivaRaman등(19)은 Gelatin과 Alginate의 혼합용액을 만들어 CaCl₂용액에서 Bead

를 만든다음 Phosphate원충용액을 사용하여 Alginate성분만을 용해하여 씻어낸 다음 Glutaraldehyde로 가교시키는 방법을 보고하였고, Lorenz등(20)은 담체로 Polyurethane Ionomer를 사용하여 기계적 강도를 높였다고 보고하였다. Zhang등(11)은 Silica를 Alginate에 첨가하여 Gel bead를 제조하였고, Silica의 첨가는 고정화 효모의 밀도를 높일뿐 아니라 기계적 강도 및 활성도를 높인다고 보고하였다.

최근에 저자의 실험실에서 연구된 결과로는 Alginate에 첨가제로서 Bentonite, 가교제로서 Glutaraldehyde를 첨가하여 Gel bead를 제조했을때 기존의 Ca-alginate bead보다 훨씬 우수한 담체로 입증되었다(21).

이상의 경우와 같이 Alginate에 화학적 또는 물리적 처리를 함으로써 기계적 강도 및 활성도를 높일 수 있다는 것이 증명되나, 아직도 많은 연구가 필요한 단계이다. 그래서 본 실험에서는 에탄올 생산성이 우수하고 Phosphate에 강하며 효모의 생존률도 높은 조건을 유지할 수 있는 고정화 담체를 개발하고, 에탄올 연속생산의 가능성을 검토한다.

3. 실험 재료 및 방법

3.1 사용균주

효모균주 k35를 Malt extract agar배지에서 30°C에 2일간 배양시킨후 4°C에서 보관하였다.

3.2 배지 및 발효

종균배지는 1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Dextrose를 사용하였고, 30°C의 Rotary shaking incubator에서 1일간 배양시킨후 종균 또는 고정화단계에서 사용하였다. 에탄올 생산배지로 5% Dextrose, 0.25% Yeast extract, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% Na₂HPO₄, 0.01% MgSO₄, 0.0001%

FeSO₄를 사용하였고 pH는 멸균전에 4.0으로 조정하였다. 회분식 발효는 100ml 종균배지 또는 생산배지를 포함한 250ml Erlenmeyer 플라스크에서, 반복회분식 발효는 500ml Erlenmeyer 플라스크에 발효배지 200ml를 넣고, Incubator에서 혐기성, 정치배양을 하였다. 발효배지는 6일마다 교환을 해주었고, 시료는 3일마다 채취하였다. 연속식 발효는 충전탑 반응기에 2%의 Dextrose가 포함된 발효배지(240ml)를 넣고 유리효모와 고정화 효모를 이용하여 수행하였다.

3.3 고정화 방법

Na-alginate(High viscosity, Sigma chemical Co.)를 적당한 농도로 증류수에 넣어 Magnetic stirrer로 녹인후 121°C, 15psi에서 멸균한다. 같은 부피의 균체 현탁액을 잘 섞은후, Peristaltic pump를 사용하여 주사바늘(21 gauge)를 통해 경화용액에 떨어뜨려 직경이 2-3mm의 Bead를 제조하였다. Bead의 완전한 겔화를 위해 4°C에서 12시간동안 경화용액에 보관하였다. 첨가제나 가교제를 혼합하는 경우에는 2%(w/v) Alginate에 적절한 농도의 흡착제나 가교제를 첨가하여 Bead를 제조한다.

3.4 분석방법

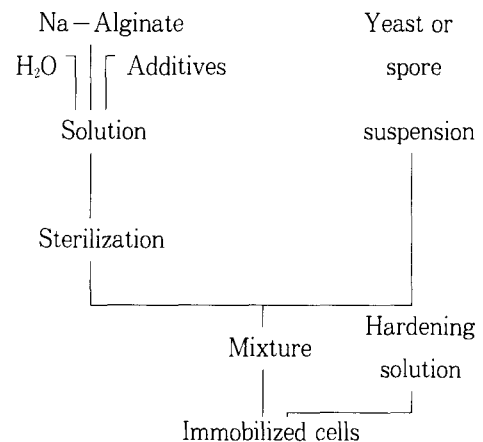
Glucose의 농도는 발효액을 원심분리시켜 얻은 상등액을 DNS방법(22)을 이용하여 분광광도계(Hitachi U-100, Japan)로 575nm에서 흡광도를 측정하여 얻었다. 생산된 에탄올은 Bernet와 Gutman(23)의 방법을 이용하여 효소적으로 정량하였으며 340nm에서 흡광도를 측정하여 에탄올을 정량하였다. 세포생존률은 Methylene Blue staining법(24)을 이용하여 측정하였고, 균체수는 발효액을 일정량 희석한후 Haemacytometer를 사용하여 계산하였으며, 균체량은 분광광도계로 570nm에서 측정하여 보정곡선에 의해 환산하여 건조중량을 얻었다. Gel내의 균체수

와 균체농도는 0.1M Phosphate완충용액(pH 7.0)에 녹인후 앞의 방법과 같이 측정하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1 회분식 배양에서 고정화의 영향

<표1-3>은 K35 효모균주의 발효특성을 보여준다. 회분식 배양에서 유리효모는 약 1.5시간만에 10g/L의 에탄올을 생산하였고, 효모의 농도는 1.8×10^{10} /ml 정도를 유지하였다<표1>. Ca-alginate bead에 고정화된 효모에 의해 생산된 에탄올과 효모의 농도는 13.5시간에 각각 10.4g/L와 1.75×10^{10} /ml로 유리효모의 경우와 거의 비슷하였다<표2>, <표3>은 기계적강도 및 화학적 안정성을 높이기위해 Alginate에 흡착제인 Celite R-634와 가교제인 Pectin을 첨가하여 제조한 ACP gel bead에 효모를 고정화한 결과이다. 효모의 농도는 유리효모나 Ca-alginate bead의 경우보다 훨씬 높았고, 약 10.5시간에 12.4g/L의 에탄올을 생산하였다. 이와같이 ACP gel bead의 경우가 효모의 성장이 우수하게 나타난 것은 Bead의 화학적구조에 따른 내부구조가 Ca-alginate의 내부구조보다 효모의 성장이 더 효율적인 것으로 사료된다.



[그림1] 고정화 효모의 제조

<표1> 효모 K35의 회분식 배양(혐기성 배양)의 결과

Time (hr)	Total cell number × 10 ⁸ /ml	Glucose (g/l)	Ethanol (g/l)
C	11.2	17.8	0.2
1.5	12.4	14.8	0.8
3.5	54.1	9.6	2.4
5.5	106.2	7.5	4.0
7.2	171.3	3.4	7.5
10.5	177.8	1.3	8.8
13.5	180.5	0.4	10.0
23.0	189.8	0.2	9.6

<표2> Ca-alginate bead에 고정화된 효모 K35에 의한 회분식 배양 (혐기성)의 결과

Time (hr)	Total cell number × 10 ⁸ /ml	Glucose (g/l)	Ethanol (g/l)
0	11.9	17.2	0.7
1.5	13.3	13.6	1.1
3.5	52.7	10.5	2.2
5.5	98.2	8.4	3.8
7.2	142.1	3.1	4.1
10.5	172.8	0.3	9.2
13.5	175.0	0.2	10.4
18.0	187.5	0.1	12.0
23.0	197.5	0.1	11.6

4.2 여러종류의 고정화 Alginate bead가 에탄올 생산에 미치는 영향

<표4>는 다양하게 제조된 Bead의 Phosphate에 대한 안정성을 살펴본 결과이다. Bead를 0.05M phosphate buffer에서 유지시켰을 때 6

<표3> ACP* gel bead에 고정화된 효모 K35에 의한 회분식 배양 (혐기성)의 결과

Time (hr)	Total cell number × 10 ⁸ /ml	Glucose (g/l)	Ethanol (g/l)
0	11.3	17.8	0.4
1.5	13.4	13.7	1.0
3.5	54.2	9.8	2.5
5.5	105.0	6.7	4.3
7.2	185.4	2.2	8.2
10.5	233.5	0.4	12.4
13.5	197.5	0.2	11.3
18.0	227.0	0.1	12.8
23.0	275.0	0	11.8

ACP* : 2% Ca-alginate+1.67%(w/v) Celite +0.33%(v/v) Pectin

<표4> 0.05M인산 완충용액에서 다양한 alginate gel bead의 안정성

Total cell release(in percent of cells initially immobilized)

Day	A	B	C	D
1	0.76	—	—	—
2	0.94	0.65	0.42	0.66
3	2.42	0.81	0.64	0.92
4	3.31	1.25	0.78	1.21
5	4.00	1.60	1.20	1.45
6	4.78	2.20	1.81	1.83

A : 2% Ca-alginate

B : 2% Ca-alginate+1.67%(w/v) Celite R-634+0.33%(v/v) Glutaraldehyde

C : 2% Ca-alginate+1.67%(w/v) Celite R-634+0.33%(v/v) Pectin

D : 2% Ca-alginate+1.67%(w/v) Bentonite+0.33%(v/v) Pectin

일후의 효모의 유출은 2% Ca-alginate는 4.78%, ACG는 2.2%, ACP는 1.8%, ABP는 1.83%로 ACP와 ABP gel bead가 안정성이 높은 것으로 나타났다.

여러 가교제와 첨가제를 이용하여 제조한 ACP gel, ACG gel(Alginate+celite R-634+glutaraldehyde), ABP gel(Alginate+Bentonite+Pectin)bead에 효모를 고정화하여 에탄올의 생산을 비교하였다[그림2]. 에탄올 생산은 6일 배양하였을때 ACP gel bead가 63g/1-gel, ABP gel bead는 48g/1-gel, ACG gel bead가 41g/1-gel로 Ca-alginate의 29g/1-gel보다 높아 전반적으로 첨가제와 가교제를 첨가하여 제조한 bead가 에탄올 생산이 높았고, 그중 ACP gel bead가 에탄올 생산이 높았다.

4.3 ACP gel bead에 의한 반복회분식 배양

[그림3]과 <표5>는 ACP gel bead에 의한 반복회분식 배양의 결과이다. ACP gel bead를 이용한 반복회분식 배양에서 에탄올 생산은 140-160g/1-gel, 효모의 농도는 34-36g/1-gel 정도를 유지하였고, Bead밖에서 자란 효모의 농도는 Run number 8(약50일)일때까지는 2.8g/1였던것이 Run number 9일때 4.18g/1로 증가되어 시간이 지남에 따라 Bead밖에서 성장하는 효모가 증가하였다. 세포의 생존율은 시간의 지남에 따라 낮아졌지만 평균 80% 이상을 유지하였다.

4.4 유리효모와 고정화 효모에 의한 연속식 배양

<표6-7>은 유리효모와 고정화 효모에 의한 연속배양의 결과이다. 연속배양에서 희석율을 변화시켰을때, 유리효모와 Ca-alginate gel bead의 최대효모농도는 희석률이 0.11h⁻¹인 경우에 각각 7.8X10¹⁰/ml, 8.76X10¹⁰/ml를 유지했지만, 에탄

<표5> ACP* gel bead에 의한 반복회분식 배양의 결과

Run Number	Cell Conc. (g/l-gel)	Cell Viability (%)	Outgrowing cell Conc. (g/l)
1	34.6	96.1	0.08
2	35.0	86.0	1.4
3	36.2	87.1	1.3
4	36.0	78.2	2.4
5	36.8	75.4	3.2
6	34.8	81.8	3.0
7	33.4	77.1	2.7
8	33.8	88.2	2.8
9	34.2	86.4	4.1
10	34.0	80.6	4.2

<표6> 효모 K35의 연속식배양(혐기성 배양)의 결과

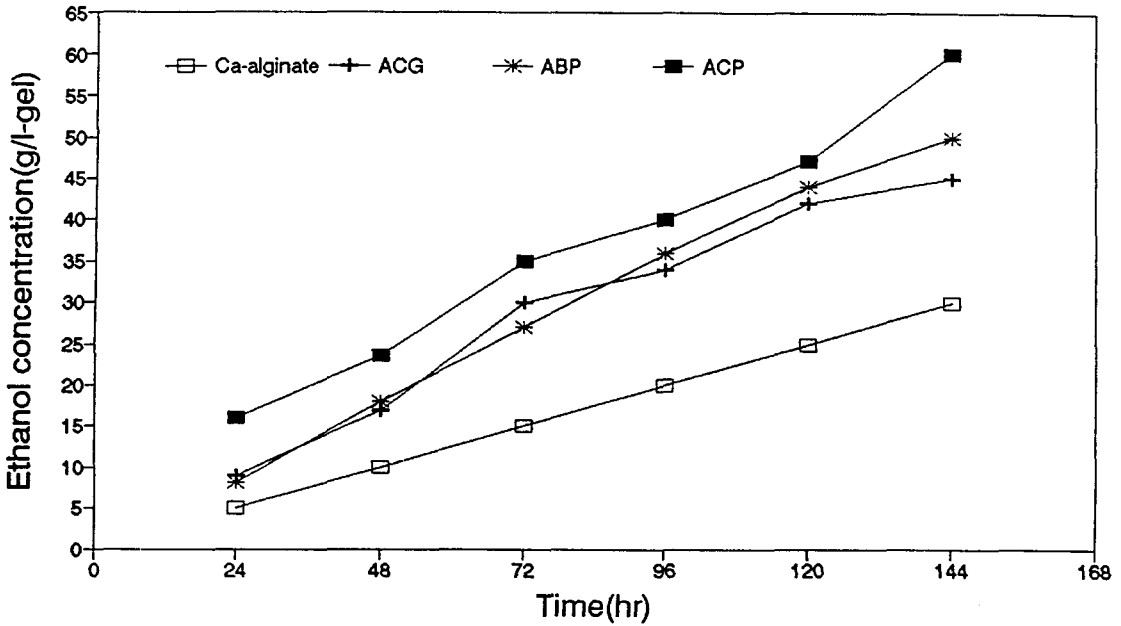
Dilution rate (hr ⁻¹)	Total cell number × 10 ¹⁰ /ml	Glucose (g/l)	Ethanol Productivity (g/l·h)
0.11	7.8	0.2	3.97
0.22	4.8	0.3	4.60
0.33	2.9	0.46	4.86

The reservoir value for glucose was (S_R) = 17.6

<표7> Ca-alginate bead에 고정화된 효모 K35에 의한 연속식배양(혐기성 배양)의 결과

Dilution rate (hr ⁻¹)	Total cell number × 10 ¹⁰ /ml	Glucose (g/l)	Ethanol Productivity (g/l·h)
0.11	8.76	0.12	4.33
0.22	7.56	0.43	4.96
0.33	7.94	0.97	4.87

The reservoir value for glucose was (S_R) = 17.2

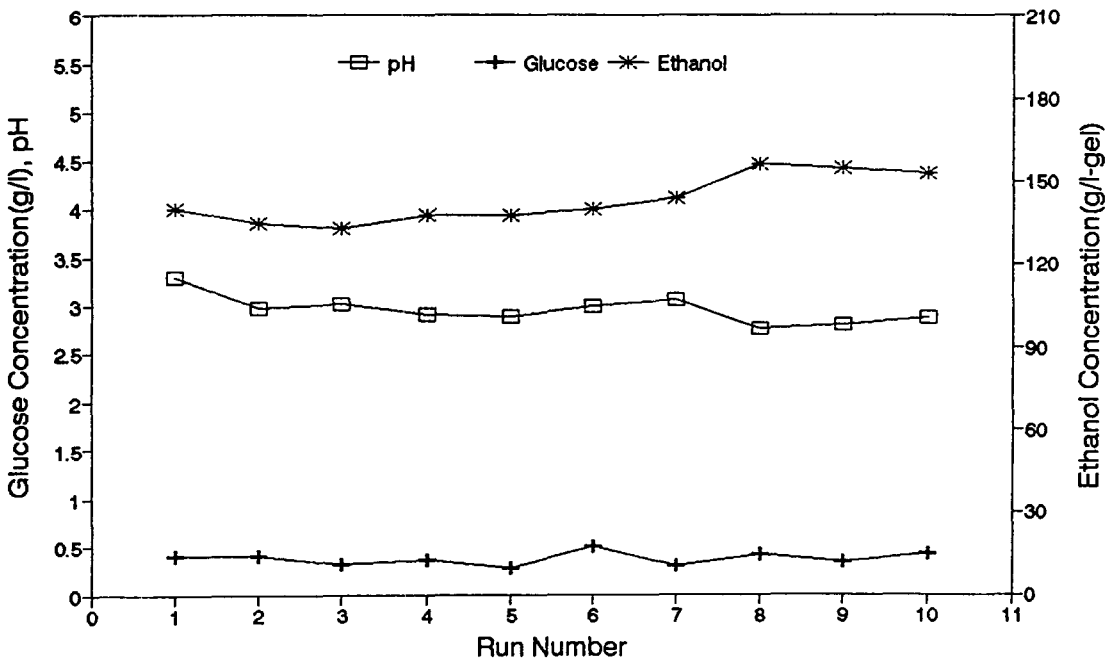


[그림2] 회분식 배양에서 다양한 Alginate bead에 의한 에탄올 생산

ACG : 2% Ca-alginate+1.67% (w/v) Celite R-634+0.33% (v/v) Glutaraldehyde

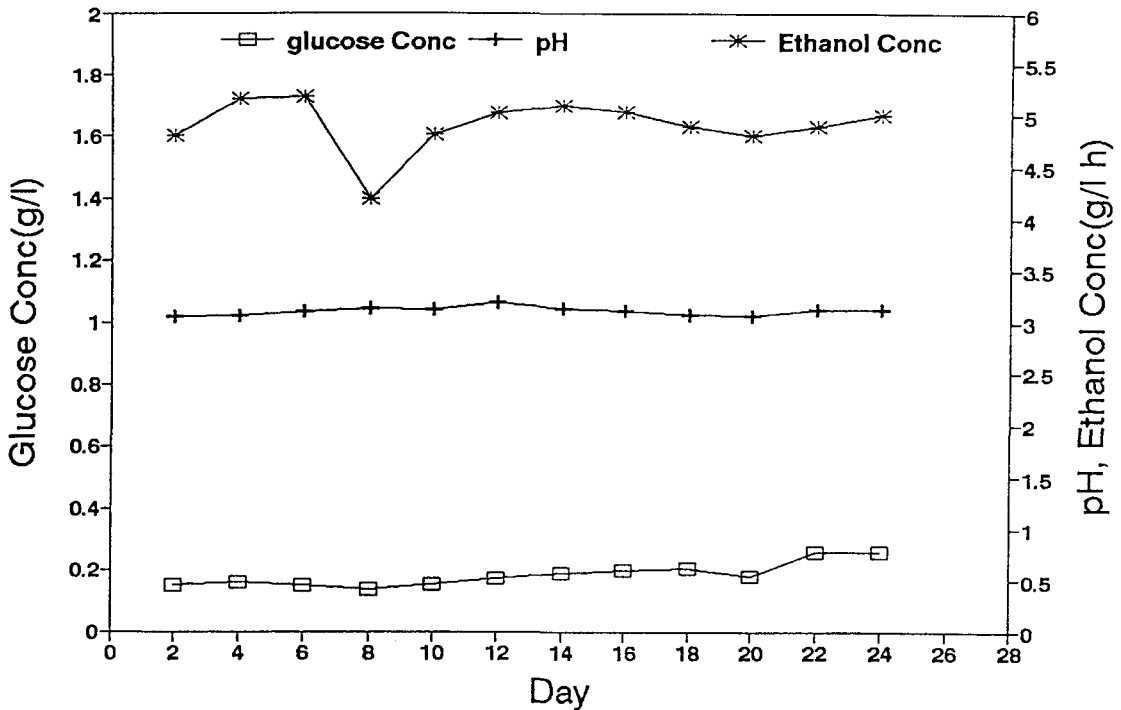
ABP : 2% Ca-Alginate+1.67% (w/v) Bentonite+0.33% (v/v) Pectin

ACP : 2% Ca-alginate+1.67% (w/v) Celite R-634+0.33% (v/v) Pectin



[그림3] ACP gel bead를 이용한 반복 회분식 배양에 의한 에탄올 생산

ACP : 2% Ca-alginate+1.67% (w/v) Celite+0.33% (v/v) Pectin



[그림 4] ACP gel bead를 이용한 연속식 배양에 의한 에탄올 생산

ACP : 2% Ca-alginate + 1.67% (w/v) Celite R-634 + 0.33% (v/v) Pectin

<표8> ACP* gel bead에 고정화된 효모 K35에 의한 연속식배양(혐기성 배양)의 결과

Dilution rate (hr ⁻¹)	Total cell number × 10 ¹⁰ /ml	Glucose (g/l)	Ethanol Productivity (g/l·h)
0.11	9.47	0.25	4.35
0.22	10.56	0.14	5.10
0.33	11.38	0.68	5.55

ACP* : 2% Ca-alginate + 1.67% (w/v) celite + 0.33% (v/v) pectin The reservoir value for glucose was (S_R) = 17.8

을 생산성을 보면 유리효모의 경우는 0.33h⁻¹에서 4.86g/1.h <표5>, Ca-alginate gel bead의 경우는 0.22h⁻¹에서 4.96g/1.h로 가장 좋았다 <표7>.

ACP gel bead의 경우는 희석률에 관계없이 높은 효모농도를 유지하였고, 에탄올 생산성도 희석

<표9> ACP* gel bead를 이용한 연속식 배양(혐기성 배양)의 결과

Day	Cell Conc. (g/l-gel)	Cell Viability (%)	Outgrowing cell Conc. (g/l)
2	33.4	92.4	-
4	34.6	91.0	0.20
6	35.0	88.1	0.48
8	35.7	86.2	0.79
10	36.0	86.0	0.76
12	36.2	85.0	1.40
14	34.4	78.1	1.80
16	35.0	78.4	2.41
18	34.5	77.0	1.90
20	35.2	75.6	4.20
22	34.6	76.0	3.40
24	34.4	72.1	3.00
26	34.0	77.2	3.20

를에 관계없이 높은 효모농도를 유지하였고 에탄올 생산성도 희석률이 $0.22h^{-1}$, $0.33h^{-1}$ 일때 각각 $5.10g/1.h$, $5.55g/1.h$ 로 높게 나타났다<표8>.

[그림4]는 ACP gel bead를 이용하여 희석률 $0.22h^{-1}$ 에서 26일동안 연속배양했을때 약 $4.93g/1.h$ 의 에탄올을 생산하였고, 효모의 농도는 약 $34.7g/1-gel$ 을 유지하였다. 세포 생존률은 26일 후에 약77%를 유지하였으며, 배지밖에서 자라는 효모는 약20일이 지나면서 증가하며 약 $3g/1$ 를 나타내었다<표9>.

5. 결 론

1. 회분식 배양에서 효모의 농도와 생산된 에탄올 농도는 ACP bead(2% Alginate+1.67% Celite R-634 + 0.33% Pectin)의 경우가 유리효모 및 Ca-alginate bead의 경우보다 훨씬 높음을 알 수 있었다.
2. 다양한 alginate bead의 회분식 배양시 에탄올 생산은 6일 배양했을때 ACP bead가 $63g/1-Gel$ 로 Ca-alginate bead, ABP bead(2% Alginate+1.67% Bentonite+0.33% Pectin) 및 ACG bead(2% Alginate +1.67% Celite R-634+0.33% Glutaraldehyde)에 비해 훨씬 높았다.
3. ACP bead를 이용한 반복회분식 배양에서 에탄올 생산은 Run number10까지 $140-160g/1-Gel$ 을 유지하였고, 세포의 생존률도 평균 80% 이상을 유지하였다.
4. ACP bead를 이용하여 연속배양을 했을때 유리효모나 Ca-alginate bead와 비교해보면, 희석률에 관계없이 높은 효모농도를 유지하였고, 에탄올 생산성도 $5.10g/1.h$ 로 높게 나타났다. 또한 ACP bead를 희석률 0.

$22h^{-1}$ 로 유지하고, 약 25일 동안 연속배양했을 때 약 $4.93g/1.h$ 의 에탄올 생산성을 보였다.

6. 참 고 문 헌

1. Maiorella, B., C.R. Wilke, and H. Blanch. Alcohol production and recovery, *Adv. Biochem. Eng.* 20:43-92(1981).
2. Nunez, M.J. and J.M. Lema. Cell immobilisation: Application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.* 9:642-651 (1987).
3. Goida, F., C. Casas, and C. Sola. A survey of continuous ethanol fermentation systems using immobilised cells. *Process Biochem.* 4:43-48(1987).
4. Margaritis, A. and F.J.A. Merchant. The technology of anaerobic yeast growth. Ch. 8. p. 231-276. In *Yeast Biotechnology*, D. R. Berry, I. Russell, and G. G. Stewart (Eds.), Allen & Unwin, London(1987).
5. Klein, J. and P. Schara. Entrapment of living microbial cells in covalent polymeric networks: I. Preparation and properties of different networks. *J. Solid Phase Biochem.* 5: 61-78(1980).
6. Smidsrod, O. and G. Skjak-Br k. Alginate as immobilisation matrix for cells. *Trends in Biotechnol.* 8: 71-78(1990).
7. Hackel, U., J. Klein, R. Megner and F. Wagner. Immobilisation of microbial cells in polymeric matrices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1: 291-293(1975).
8. Han, M. S. and D. H. Chung. Ethanol production using alginate immobilised cells of

- Zymomonas mobilis*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 588–596(1992).
9. Cheetham, P. S. J., K. W. Blunt, and C. Bucke. Physical studies on cell immobilisation using calcium alginate gels. Biotechnol. Bioeng. 21: 2155–2168(1979).
 10. Fukushima, Y., K. Okamura, K. Imai, and H. Motai. A new immobilisation technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate. Biotechnol. Bioeng. 32: 584–594(1988).
 11. Zhang, Z., E. Su, and J. Yu. Studies on continuous and rapid fermentation of beer by immobilised yeast. Int. Ind. Biotechnol. 9: 21–25(1989).
 12. Tanaka, H., M. Matsumura, and I. A. Veliky. Diffusion characteristics of substrates in Ca–alginate gel beads. Biotechnol. Bioeng. 26: 53–58(1984).
 13. Hannoun, B. J. M. and G. Stephanopoulos. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell–free and cell–occupied calcium alginate membranes. Biotechnol. Bioeng. 28: 829–835(1986).
 14. Kim, K., Y–I. Sunwoo, and S–C. Park. Effective diffusivity of substrate of an immobilised microorganism in Ca–alginate gels. Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 4: 110–117(1989).
 15. Toda, K. and M. Shoda. Sucrose inversion by immobilised yeast cells in a complete mixing reactor. Biotechnol. Bioeng. 17: 481–497(1975).
 16. Shiotani, T. and T. Yamane. A horizontal packed–bed bioreactor to reduce CO₂ gas hold–up in the continuous production of ethanol by immobilised yeast cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13: 96–101(1981).
 17. Veliky, I. A. and R. E. Williams. The production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilised in polycation–stabilised calcium alginate gels. Biotechnol. Lett. 3:275–280(1981).
 18. Birnbaum, S., R. Pendleton, P. O. Larsson and K. Mosbach. Covalent stabilisation of alginate gel for the entrapment of living whole cells. Biotechnol Lett. 3: 393–400 (1981).
 19. SivaRaman, H., B. S. Rao, A. V. Pundle, and C. SivaRaman. Continuous ethanol production by yeast cells immobilised in open pore gelatin matrix. Biotechnol. Lett. 4: 359–364(1982).
 20. Lorenz, O., F. Haulena, and G. Rose. Immobilisation of yeast cells in polyurethane inomers. Biotechnol. Bioeng. 29: 388–391(1987).
 21. Kim, E–Y., S–W. Kim, and K. Kim. Ethanol production by a new method of alginate–Immobilisation. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 373–380(1993).
 22. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426–428(1959).
 23. Bernet, E. and I. Gutman. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD. 1499–1502. H. U. Bergmeyer(Ed), In Methods of enzymatic analysis: 3 Academic Press, New York(1974).
 24. Pierce, J. S. Measurement of yeast viability. J. Inst. Brew. 76: 442–443(1970).