한국농화학회지 제 40권 제 2호(1997)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 40, No. 2, pp. 89~94(1997)

*Aspergillus awamori*와 *Zymomonas mobilis*로 구성된 혼합고정화 배양계의 에탄올 생산에 미치는 Neupectin-L의 영향

이상원 · 조용운[1] · 김홍출[1] · 박석규[2] · 성낙계*

경상대학교 식품공학과, [1]진주산업대학교 미생물공학과,
[2]순천대학교 식품영양학과

초록 : *Aspergillus awamori*(A)와 *Zymomonas mobilis*(Z)로 구성된 혼합고정화 배양계(A-Z 36계)의 특성을 이용하여 생전분으로 부터 직접 에탄올생산을 행할 때 투입되는 에너지를 절약할 목적으로 비가열살균 배양법을 검토하였다. A-Z 36계에 의한 비가열살균 배양은 배지에 함유된 세균 때문에 어려웠다. Sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, Vantocil IB, Neupectin-L 등의 여러 가지 살균제 중에서 Vantocil IB와 Neupectin-L은 잡균의 오염없이 대조구와 비슷한 속도로 기질을 분해하였다. 0.1% Neupectin-L은 대조구보다 약간 높은 6.9 g/*l*(대조구 : 6.4 g/*l*)의 에탄올을 생산하였다($Y_{p/s}$: 0.39). 0.1% Neupectin-L을 첨가한 유가배양에서는 2% 기질을 기본으로 5회분의 기질을 첨가하여 34 g/*l*의 에탄올을 얻어 2.0 g/*l*/day의 생산성을 나타내었다.
(1996년 11월 19일 접수, 1997년 1월 31일 수리)

서 론

Biomass로부터 물질생산을 행할 때 생산공정 중의 소비에너지 절약은 생산에너지 수율을 향상시키기 위해서 매우 중요하다. 알코올생산 공정 중에서 가장 에너지를 요하는 것은 알코올의 증류공정이다. 이 공정에서 소비에너지는 생산된 알코올로 부터 얻어진 에너지의 50%나 되는 것으로 알려져 있으므로, 이를 개선하기 위해서 증류탑의 단열, 탑의 정상부에서 발생하는 증기잠열의 유효한 이용 등이 검토되고 있다.[1]

증류법에 관계없이 에탄올을 농축하는 방법으로서 막분리법, 용매추출법 등도 검토되고 있으며, 감압으로 에탄올 발효를 행하는 새로운 방법의 검토도 행하여 지고 있다.[2-4] 또한 고온에서 알코올을 생산하는 미생물의 분리도 행하여지고 있으며,[5] 발효열을 효율적으로 이용하여 고온에서 발효시키는 방법도 검토되고 있다.[6] 또 pH의 조절이나 살균제를 이용하여 기질, 배지, 발효장치 등을 가열살균하지 않고 알코올발효에 이용하는 연구도 활발히 검토되고 있다. Hariantono 등[7]은 *Schizosaccharomyces pombe*가 생산하는 배양액 중의 에탄올 농도가 높은 것과, 이 효모의 최적 pH가 낮은 것을 이용하여 옥수수 생전분으로부터 에탄올을 비가열 살균발효법으로 생산하였다.

전분질을 비가열 살균법으로 알코올 발효를 행하면 증자에 필요한 에너지를 절약할 수 있다. 당질원료의 경우는 효모가 당을 직접 에탄올로 전환시킬 수 있지만, 전분질의 경우에는 먼저 가열처리에 의해서 전분을 호화시켜 amylase로 전분의 액화 · 당화를 행하여 발효성 당으로 전환시킨 다음, 효모나 *Zymomonas mobilis*와 같은 알코올 생산균에 의해서 에탄올로 전환된다. 일반적으로 생전분 원료의 경우에는 증자 · 액화 · 당화에 필요한 에너지량은 에탄올 생산을 위한 에너지량의 30%나 되기 때문에 증자에너지의 절감은 기술개발의 큰 과제로 대두되고 있다.

본 연구자들은 전보[8,9]에서 *Aspergillus awamori*(A)와 *Z. mobilis*(Z)로 구성된 A-Z 24계의 혼합 고정화 배양계를 개발하여 생전분으로부터 에탄올 생산을 행하였다. 이 혼합고정화 배양계는 ① 배양 24시간째부터 혐기적인 상태로 배양하기 때문에 호기성 미생물의 오염가능성이 적고, ② 두 균주를 혼합고정화했기 때문에 생전분으로부터 생성한 glucose의 소비가 빨라 배양액에는 glucose의 축적이 나타나지 않으며, ③ 최종산물이 에탄올인 점 등의 특징이 있다. 또한 ④ 인위적으로 살균제를 첨가하였을 경우 gel bead 표면부에 생육하는 곰팡이 균사와 gel bead 자신이 살균제의 영향을 어느 정도 약화시키므로 고정화된 균주에 미치는 영향이 적어질 것으로 추측되는 등의 특징을 가지고 있다.

이러한 점을 고려하여 본 연구에서는 살균제 첨가에 의한 무증자 당화법의 개발을 행하였다. Biomass로부터 물질생산을 행할 때 최대의 문제점으로 지적되고 있는 에너지 수율을 높일 목적으로 비교적 고분자의 살균제를 사용하여 생전분 배지 및 배양장치 등을 살균하지 않고 그대로 에탄올 생산을 행하는 무증자 발효법의 하나인 비가열 살균법에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

호기성 곰팡이로서 *A. awamori* IFO 4033을, 혐기성 에

찾는말 : immobilization, ethanol production, *Aspergillus awamori*, *Zymomonas mobilis*, Neupectin-L.
*연락저자

탄올 생산균은 *Z. mobilis*를 사용하였다. 공시균주의 모든 배지성분은 전보[8]와 동일하다. 단 비가열살균 배양을 행할 때는 살균제를 첨가하여 사용하였다.

살균제

살균제로 식품첨가물인 sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid는 0.2%, *p*-hydroxybenzoic acid(Tokyo Kasei Co.)는 0.01%, 천연 식품첨가물인 Neupectin-L (Asama Kasei Co.)은 0.1~0.5%와 항균제인 Vantocil IB (Kao Asama Co.)는 0.2%를 각각사용하였다. Vantocil IB는 식품산업에서 용기의 소독 및 살균에 이용되고 있으며, 포유류에 대한 독성은 매우 낮은 것으로 알려져 있다. Neupectin-L은 천연물로 구성된 식품보존제로 대장균, 유산균 등에 대하여 강한 항균력을 나타내고 식품에 첨가하면 풍미가 향상되는 등 지금까지 알려진 일반적인 식품첨가물과는 형태가 다른 식품보존제로 보고되어 있다.[10]

고정화법 및 배양조건

고정화할 때 곰팡이의 포자현탁액은 곰팡이 사면배지에 Tween 80이 포함된 멸균수 10 m*l*를 넣어 포자농도가 1.25×10^6spore/ m*l*-gel 되게 하였으며, 세균의 세포현탁액은 *Z. mobilis*를 증식배지(glucose 10%, yeast extract 1%, KH_2PO_4 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.05%, pH 5.0) 30 m*l* 중에서 30℃로 18시간 정치배양한 후의 배양액을 원심분리하여 세포현탁액의 농도가 0.5 g cell/*l*-gel로 되게 하였다.

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

혼합고정화는 포자 및 세포현탁액을 3% Na-alginate용액에 정량적으로 첨가하여 혼합한 후, 단독고정화법과 동일하게 행하였다.

배양은 단독고정화 및 혼합고정화한 gel bead 35 g을 200 m*l* 본 배양배지를 함유한 500 m*l* 삼각 플라스크에 각각 옮겨 30℃에서 220 rpm으로 진탕 배양하였으며, fed-batch 배양은 1 *l* jar fermentor(Iwashiya, Bioscience, Co. Ltd.)에 본 배양배지 500 m*l*와 gel bead 85 g를 접종하여 행하였다. 이때 pH는 1N-NaOH를 사용하여 4.3 이하로 되지 않도록 조절하였고, 시료채취는 24시간 마다 행하였다.

오염균 분리

증류수, 배지 및 생전분에 포함되어 있는 오염균은 일반적인 분리법에 따라 각각 분리하였다. 즉 증류수의 경우는 멸균한 500 m*l* 삼각 플라스크에 멸균하지 않은 증류수 200 m*l* 넣고, 30℃, 220 rpm으로 진탕배양하면서 24시간 마다 시료를 채취하여 nutrient broth배지에 도말하여 나타난 colony로부터 분리하였다. 배지 및 생전분으로 부터 분리할 경우는 멸균수 200 m*l*에 사용하는 모든 배지성분과 생전분을 각각 멸균하지 않은 상태로 첨가하고 증류수로 부터 오염균 분리법과 동일하게 행하였다.

에탄올 및 당의 분석

배양액 중의 에탄올농도와 glucose농도의 측정은 전보[8]에 준하였고, 총당량은 phenol-sulfuric acid법으로 정량하였으며,[11] 비 glucose 당량은 총당량에서 glucose 양을 뺀 것으로 하였다.

Gel bead의 표면 및 내부관찰

Gel bead 단편의 관찰은 배양이 끝난 gel bead를 면도칼로 절단하여 위상차 현미경(Carl Zeiss Jene, Germany)으로 배율 200배에서 행하였다.[12] 전자현미경으로 gel bead 중심부의 세균관찰을 위해서는 배양이 끝난 gel bead를 증류수로 3번 세척하고 2.5% glutaraldehyde 용액에 하룻밤, 1% OsO_4 용액에 2시간 각각 방치하였다. 이를 다시 증류수로 세척한 후 30~100% 에탄올 용액에 담구어 탈수시킨 후 아세톤에 담구어 건조시켜 전자현미경 촬영시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

본 연구자들은 전보[8,9]에서 산소 요구성이나 성질이 전혀 다른 *A. awamori*(A)와 *Z. mobilis*(Z)로 구성된 새로운 혼합고정화 배양계(A-Z계)를 개발하여 그 이용법의 하나로서 난분해성의 생전분으로부터 에탄올 생산에 응용하였다. 이 A-Z계는 ① 에탄올의 수율이 낮고 ② 배양액의 pH가 4.0 이하로 낮아져 에탄올 생산균인 *Z. mobilis*의 활성을 저하시키고 ③ gel bead로부터 곰팡이 균사의 누출현상 등이 관찰되었다. 따라서 곰팡이 균사의 과잉생육을 억제하고, 전분으로부터 생성한 glucose를 *Z. mobilis*가 우선적으로 이용할 수 있도록 배양 36시간째부터 배양조건을 혐기적으로 전환한 A-Z 36계는 2% 생전분으로부터 6.4 g/*l*(Yp/s=0.36)의 에탄올을 생산하여 대조구보다 2배 높은 수율을 얻었다. 또한 A-Z 36계는 배양 36시간째부터 혐기적으로 배양을 행하기 때문에 호기성 미생물의 오염가능성이 적게되고, 또 산소요구성이 서로 다른 호기성 곰팡이와 혐기성 세균을 혼합고정화했기 때문에 잡균의 오염을 방지할 목적으로 살균제를 첨가하여도 gel bead의 표면부에 증식하고 있는 곰팡이 균사와 gel bead 자체가 살균제의 gel 내부로 이동을 방해하여 gel bead 내부에 증식하고 있는 혐기성의 *Z. mobilis*에 미치는 영향이 적을 것으로 사료된다.

이러한 A-Z 36계의 특징을 고려하여 biomass로부터 에탄올 생산을 행할 때 최대의 문제점으로 대두되고 있는 에너지 수율을 높이기 위해서 살균제의 첨가에 의한 비가열살균 발효법을 검토하였다.

먼저 A-Z 36계의 잡균방어력에 대하여 검토하였다. 본 연구에 사용되고 있는 배지 및 장치 등을 멸균하지 않고 30℃, 220 rpm으로 에탄올 발효를 행하였다. 그 결과 배양 24시간째부터 세균이 관찰되어 48시간째 부터는 잡균이 원

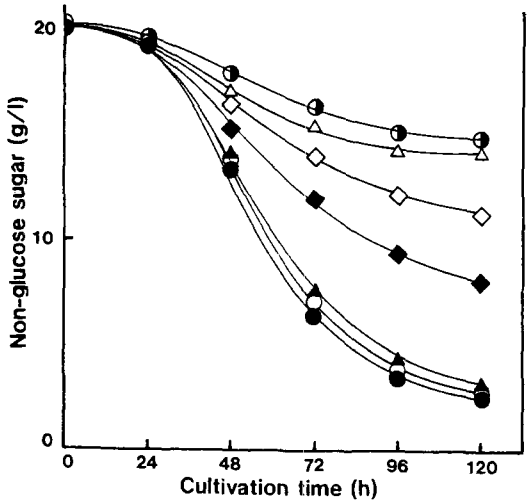

Fig. 1. Effect of various bactericidal agents on raw starch hydrolysis by A-Z 36 system. Control (●—●), Neupectin-L(○—○), Vantocil IB(▲—▲), Dehydroacetic acid(◑—◑), Benzoic acid(△—△), Sorbic acid(◇—◇), *p*-Hydroxybenzoic acid(◆—◆).

인으로 생각되는 악취가 발생하였다. 이 결과로부터 A-Z 36계 단독으로는 비가열 살균이 불가능한 것으로 판단하고 살균제로서 4종류의 식품첨가물과 항균제인 Vantocil IB 및 천연 식품첨가물인 Neupectin-L을 사용하여 살균제가 생전분 분해에 미치는 영향에 대하여 검토하였다(Fig. 1). 대조구로서는 살균제를 첨가하는 대신에 생전분과 배지를 각각 γ선 및 가열살균하여 사용하였다. 살균제를 첨가한 모든 배양계에서는 오염된 잡균의 증식없이 기질을 분해하였으나 살균제의 종류에 따라 분해율은 많은 차이를 보였다. 그 중에서도 식품첨가물인 dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid, *p*-hydrobenzoic acid는 그 살균력이 고정화된 곰팡이에도 영향을 주어 기질의 분해가 매우 늦었다. 그러나 항균제인 Vantocil IB와 천연 식품첨가물인 Neupectin-L은 대조구와 동등한 속도로 기질을 분해하였다. 이러한 결과는 다른 살균제보다 비교적 분자량이 큰 Vantocil IB와 Neupectin-L이 gel bead내부로 이동할 수 없었기 때문인지 또는 Vantocil IB와 Neupectin-L이 곰팡이의 생육에는 영향을 미치지 않으면서 gel bead의 외부에 생육하는 곰팡이 균사와 gel bead 자체에 흡수되었기 때문인지 정확히는 알 수 없지만 이와 같은 두가지 원인으로 인하여 나타난 현상으로 추측된다.

그리고 Vantocil IB는 항균제이기 때문에 에탄올 발효후에도 배양액이 환경오염 등을 일으킬 우려가 있으므로 천연 식품첨가물인 Neupectin-L을 선택하였다. Neupectin-L은 주성분이 pectin 분해물이며, 천연물로 구성된 식품보존제로서 대장균과 유산균에 대하여 강한 항균력을 나타내고 식품에 첨가하면 풍미가 향상되는 등 지금까지 알려진 식품 첨가물과는 다른 것으로 보고되고 있다.[10]

공시균주에 미치는 Neupectin-L의 영향

A-Z 36계를 사용하여 알코올발효를 행할 때는 배양 36시간째부터 특수 개발한 check valve를 부착한 실리콘으로

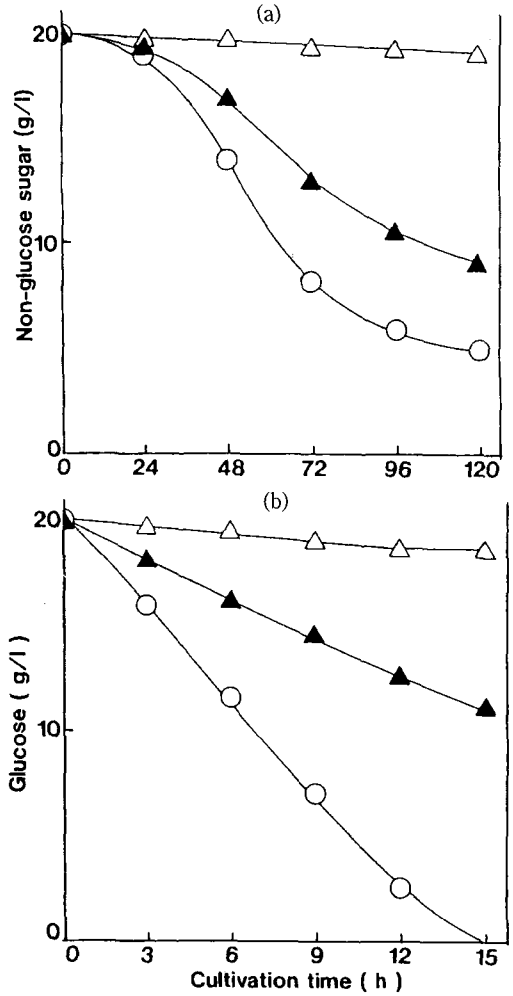

Fig. 2. Effect of Neupectin-L on raw starch hydrolysis by *Aspergillus awamori*(a) and glucose consumption by *Zymomonas mobilis*(b). Immobilized cells without Neupectin-L(○—○), Immobilized cells with 0.5% Neupectin-L (▲—▲), Free cells with 0.5% Neupectin-L(△—△).

혐기적 배양을 행하기 때문에 배양조 내부는 산소가 적은 상태로 된다.[8,9] 또 호기성 곰팡이가 생전분을 분해하여 glucose를 생산함과 동시에 에탄올 생산균인 *Z. mobilis*가 glucose를 소비하기 때문에 미량의 Neupectin-L 농도에서도 잡균의 증식이 억제되어 효율적으로 에탄올을 생산할 것으로 기대된다. 이러한 사항을 검토할 목적으로 배지에 Neupectin-L을 0.5% 첨가하고 *A. awamori*와 *Z. mobilis*를 각각 단독고정화와 현탁배양을 행하여 살균제가 각 균주에 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 2). *A. awamori*는 액체 배양계에서 약 5%, 고정화 배양계에서 약 55% 정도의 기질이 분해되었으며, *Z. mobilis*는 고정화배양계에서 약 40%의 기질을 분해되었다. 균주에 따라 Neupectin-L에 대한 감수성의 차이는 있을 것으로 생각되나 본 연구에 사용한 *Z. mobilis*는 살균제에 대하여 *A. awamori*보다 더 민감한 것으로 나타났고, 또한 현탁배양보다 균주를 고정화함에 의해서 Neupectin-L이 공시균주에 미치는 영향을 억제 할 수 있었다. 이러한 결과로부터 천연 식품첨가물인 Neupectin-L을 배지에 첨가하여 비가열살균법에 의한 A-Z 36계의 이

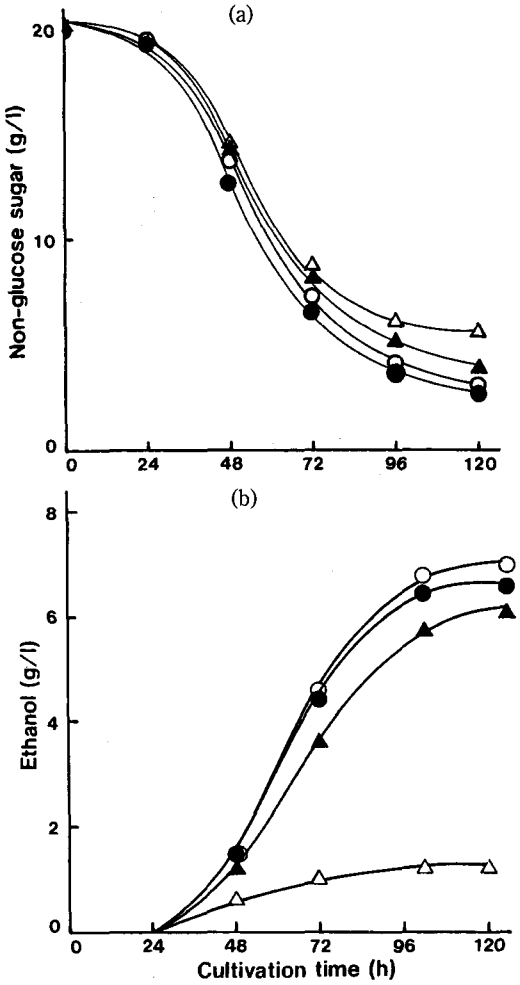

Fig. 3. Effect of various concentrations of Neupectin-L on raw starch hydrolysis(a) and ethanol production(b) by A-Z 36 system. without Neupectin-L(●—●), 0.1% Neupectin-L(○—○), 0.2% Neupectin-L(▲—▲), 0.5% Neupectin-L(△—△).

용가능성을 확인할 수 있었다.

A-Z 36계에 미치는 Neupectin-L의 농도

A-Z 36계의 비가열살균법에 의한 에탄올 발효에 미치는 Neupectin-L의 최적농도를 검토할 목적으로 2% 생전분 배지에 0.1, 0.2, 0.5%의 Neupectin-L을 첨가하고 각 농도에서 에탄올 발효를 행하였다(Fig. 3). 모든 배양계에서 오염균의 증식은 관찰되지 않았지만, Neupectin-L의 첨가농도를 증가시킴에 따라서 기질분해성이 낮아졌다. 0.5% 첨가의 경우는 0.1, 0.2% 첨가보다 기질분해 속도가 훨씬 늦었고, 에탄올 생산량도 낮았다. 그러나 Neupectin-L을 0.1% 첨가한 경우는 기질의 분해 속도가 대조구보다 약간 늦게 나타났지만 에탄올 생산은 배양 24시간째부터 급격하게 증가하여 배양 96시간 째에 대조구보다 0.5 g/*l* 정도 높은 6.9 g/*l*의 에탄올이 생산되어 0.39의 수율(Yp/s)을 나타내었다. 이와 같은 결과는 배양 중에 산소공급을 제한함과 동시에 살균제를 첨가함에 따라 gel bead 표면부에 있는 곰팡이 균사의 생육이 억제되었기 때문에 상대적으로 gel bead 중심부에 있는 *Z. mobilis*가 glucose의 소비를 더 많이 한 결과

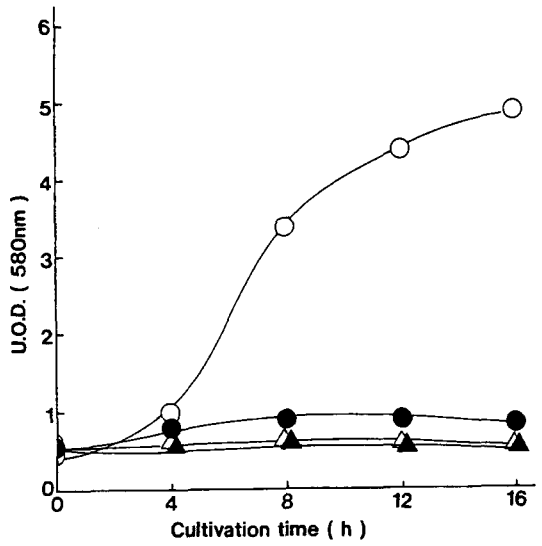

Fig. 4. Effect of Neupectin-L on growth of isolated microbial contaminants of the medium. without Neupectin-L(○—○), 0.1% Neupectin-L(●—●), 0.2% Neupectin-L(△—△). 0.5% Neupectin-L(▲—▲).

에탄올 생산성이 약간 증가한 것으로 생각된다. 그리고 0.5% Neupectin-L을 첨가했을 때 소비된 기질에 비하여 에탄올 생성량이 현격하게 적은 것은 첨가된 Neupectin-L의 량이 너무많아 그독성이 *A. awamori* 보다 *Z. mobilis*에 더 강하게 미쳐 *Z. mobilis*의 에탄올 생산활성이 약해졌기 때문으로 추측된다.

또한 잡균의 주요 오염원인 전분, 증류수 및 배지 등으로부터 약 15균주의 세균을 분리하였으며, 그 중에 증식이 가장 빠른 세균을 선택한 후 Neupectin-L을 첨가한 *Z. mobilis*의 전배양 배지(2% 기질농도 사용)에 현탁배양을 하면서 경시적으로 unit optical density(U. O. D.)를 측정하여 Fig. 4에 나타내었다.

Neupectin-L을 첨가하지 않은 대조구는 배양초기에 3시간 동안 유도기가 나타났지만, 그 이후는 급격하게 증식하였다. 그러나 Neupectin-L을 0.1~0.5% 첨가한 것은 거의 증식하지 않았으며, 배양 16시간째에 배지 중의 기질농도를 측정한 결과, 대조구에서는 약 0.6 g/*l*, Neupectin-L를 첨가한 구에서는 약 18~19 g/*l*의 glucose가 측정되었다.

이상의 결과로 0.1% Neupectin-L의 농도는 잡균의 생육을 억제하기에 충분한 농도인 것으로 확인되었다.

Gel bead의 균주 분포상태

0.1% Neupectin-L을 첨가한 혼합고정화 배양계(A-Z 36계)를 사용하여 생전분으로부터 에탄올 발효를 행한 후 gel bead 내의 균사 및 세균의 형태와 배양후의 gel bead 양상을 관찰하여 Fig. 5에 나타내었다. Gel bead를 무작위로 취하여 그 형태를 관찰한 결과, gel bead자체는 Neupectin-L에 대한 영향은 전혀 받지 않으면서 매우 안정된 형태를 유지하였다(Fig. 5-a). Gel bead내의 균주분포상태를 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 살균제의 영향을 비교적 받기 어려운 호기성의 곰팡이 균사는 gel bead의 표면부에 많은 균사

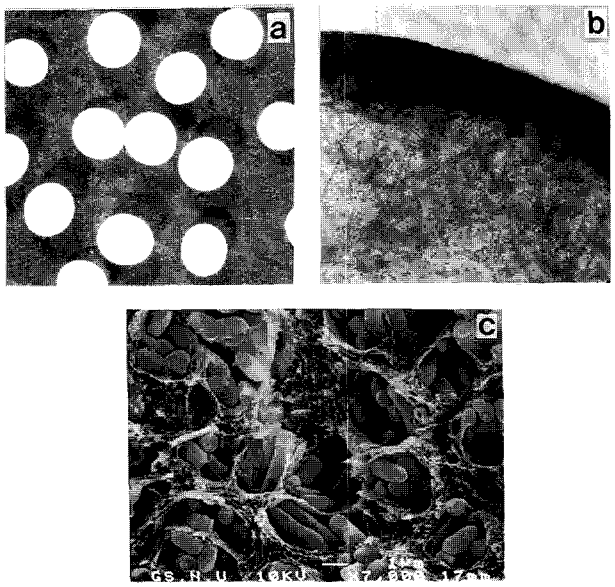

Fig. 5. Microphotograph of whole(a) and cross section(b, c) of co-immobilized A-Z 36 system after cultivation in a medium containing 0.1% of Neupectin-L.

층을 형성하여 생육하였고, 살균제의 영향을 비교적 받기 쉬운 혐기성의 *Z. mobilis*는 gel bead의 중심부에서 생육함을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-b). 또한 gel bead 중심부에 생육하는 *Z. mobilis*의 형태를 전자현미경으로 관찰한 결과에서도 *Z. mobilis*는 배양액에 첨가한 Neupectin-L의 영향을 전혀 받지 않으면서 왕성한 생육을 하고 있었다(Fig. 5-c).

유가배양에 의한 에탄올 생산

A-Z 36계를 사용하여 비가열 살균법에 의한 에탄올 발효를 행할 때 잡균오염을 방지할 목적으로 가열살균 대신에 천연식품 첨가물인 Neupectin-L을 첨가하고, 장기배양에 따른 Neupectin-L의 살균력에 대하여 검토하였다. 즉 초기 기질농도는 2%를 기본으로 하였으며 살균제로서 0.1% Neupectin-L을 살균제로 첨가하고 배지, 생전분 및 배양장치 등을 살균하지 않고 사용하였다. 산소공급은 배양 36시간째까지 행하고, 그 이후는 질소가스를 공급하여 용존 산소농도를 0 ppm으로 유지시키면서 유가배양을 행하였다(Fig. 6).

배양시간이 장기화됨에 따라 배양후기에 잡균의 증식이 관찰되어 배양 72시간과 168시간에 다시 0.1%의 Neupectin-L을 각각 첨가하였다. 장시간에 걸친 혐기상태에도 불구하고 배양액 중의 glucoamylase의 활성은 3일 이후부터 일정한 값(20 units/m*l*)을 나타내었으며(결과미 제시), 5회분의 기질을 첨가하는 동안 기질의 가수분해 속도 및 에탄올 수율의 감소는 나타나지 않았다. 최종적으로 34 g/*l*의 에탄올이 얻어져 생산성은 2.0 g/*l*/day가 얻어졌다.

이 결과는 가열살균 배양을 행한 대조구보다 3 g/*l*가 높은 에탄올 생산성을 나타낸 것으로 배지에 0.1% Neupectin-L을 첨가함에 따라 배지, 생전분 및 배양장치를 살균하지 않고 에탄올발효를 행하여도 종래의 가열살균법에

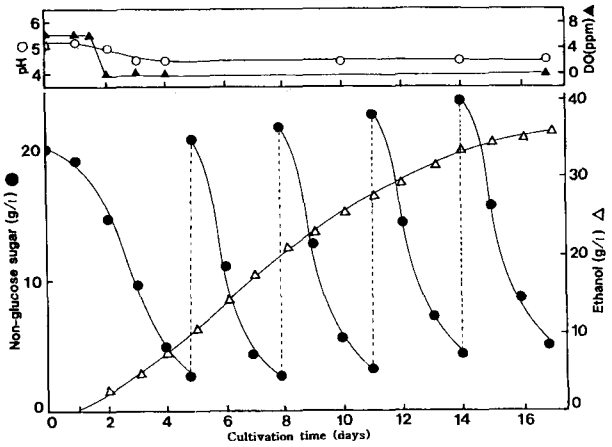

Fig. 6. Fed-batch fermentation with A-Z 36 system.

의한 것과 거의 대등한 수율을 얻을 수 있었다. 따라서 본 연구자들이 개발한 A-Z 36계는 비가열살균법에 의한 적은 에너지로서 에탄올발효를 행할 수 있는 공정에 충분히 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 花井四郎 (1982) エタノール 醱酵技術, エタノール工業(醱酵工業協會編), p.106-119 醱 酵工業協會.
2. Mori, Y. and Inaba, T. (1990) Ethanol production from starch in a pervaporation membrane bioreactor using *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 849-853.
3. アルコール・バイオマス技術開發室 (1986) 燃料用アルコール技術開發, *NEDO NEWS*, **6**, 3-5.
4. Saiki, T. (1987) New technology of ethanol fermentation. *J. Microorganism*, **3**, 555-564.
5. 森隆 (1989) 好熱嫌氣性細菌を用いたセルロースからの直接エタノール醱酵. 食糧, **28**, 75-97.
6. Yamazawa, S. (1987) The problem points on methane fermentation, *J. Microorganism.* **3**, 565-575.
7. Hariantono, J., S. Takao and F. Tomita (1991) Ethanol production from raw starch by simultaneous fermentation using Schizosaccharomyces pombe and a raw starch saccharifying enzyme from *Corticium rolfsii*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 367-369.
8. 이상원, 박석규, 손봉수, 최수철, 서권일, 성낙계, 김홍출 (1995) *Aspergillus awamori*와 *Zymomonas mobilis*로 구성된 혼합고정화 배양계의 최적 조건. 한국영양식량학회지 **24**, 803-810.
9. 이상원, 서권일, 박석규, 손봉수, 김홍출, 성찬기 (1995) *Aspergillus awamori*와 *Zymomonas mobilis*로 구성된 고정화혼합 배양계의 에탄올 생산에 미치는 Triton, PVA 및 PEG의 영향. 순천대 기초과학연구지 **6**, 79-88.
10. 野崎一彦, 上澤佳乃 (1985) ペクチン分解物による天然食品保存劑について. *New Food Industry*, **27**, 45-49.
11. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers and F. Smith (1956) Colorimetic method for determination of

sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-354.
12. Abdel-Halim, M., M. El-Sayed and H. J. Rehm (1986) Morphology of *Penicillium chrysogenum* strains immobilized in Ca-alginate beads and in penicillin fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 89-94.

Effect of Neupectin-L on Ethanol Production from Raw Starch Using a Co-Immobilized *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*

Sang-Won Lee, Yong-Un Cho[1], Hong-Chul Kim[1], Seok-Kyu Park[2] and Nack-Kie Sung* (*Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea; [1]Dept. of Microbiological Engineering, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea; [2]Dept. of Food and Nutrition, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea*)

Abstract : In order to reduce energy input in direct ethanol production from raw starch by co-immobilized *Aspergillus awamori*(A) and *Zymomonas mobilis*(Z), A-Z 36 culture system which was changed to anaerobic after 36 h of aerobic fermentation without sterilization was investigated. This immobilized cell system can not be carried out under unsterile conditions because of growth of microbial contaminants from original medium. Among some food additives such as sorbic acid, benzoic acid, dehydroacetic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, Vantocil IB and Neupectin-L, Vantocil IB and Neupectin-L were a potent antibacterial agent in A-Z 36 culture cell system and were not affected in hydrolysis of substrate as compared with the case of control. Ethanol yield(6.9 g/*l*) in system of addition of 0.1% Neupectin-L was slightly higher than that in control(6.4 g/*l*). When 2% starch was fed five times in fed-batch culture with 0.1% Neupectin-L, ethanol yield and productivity were 34 g/*l* and 2.0 g/*l*/day, respectively.

Key words : immobilization, ethanol production, *Aspergillus awamori, Zymomonas mobilis*, Neupectin-L.
*Corresponding author