

Immobilized Biocatalysts를 이용한 環境性 廢棄物質 抑制에 관한 연구

(제3보) 알코올 발효를 위한 Immobilized Biocatalyst 제조

金 成 器

韓國放送通信大學

Studies on the Control of Environmental Wastes by Means of Immobilized Biocatalysts

(Ⅲ) Preparation of Immobilized Biocatalyst to Ethanol Fermentation

Sung Kih Kim

Korea Air and Correspondence University Seoul, Korea

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae was immobilized by incubating iron oxides with calcium alginate, and by polyacrylamide entrapment to use repeatedly for the conversion of glucose to ethanol.

Magnetic and non-magnetic immobilized yeast and polyacrylamide immobilized yeast were compared with the native yeast a batch-fermentation of ethanol from glucose. Three kinds of immobilized yeast tended almost identically, having ethanol productivity as well as the final yield about the same to what was found for the native yeast.

The long-term operational stability of three kinds of immobilized yeast were significant difference according as immobilized yeast activation or non-activation before ethanol fermentation. In the non-activation they lost their activity of fermentation rapidly in the beginning stage and slower at a later stage. On the other hand, in the activation with nutrient media, their activities were increased to some extent and stable in the later stage.

The cell count of three kinds of immobilized yeast after activation by incubating nutrient media, increased by a factor of about 45 to 48, whereas the fermenting capacity increased by a factor of 174 to 178.

In the preparation of immobilized biocatalysts, magnetic matter does not seem to have any adverse affect on the properties of the microorganism. The immobilized biocatalysts by utilizing magnetic matter have some advantages, especially in application of viscous media or insoluble particle-containing media, for this work was linked with microbial utilization of environmental wastes and elimination of environmental pollutant.

I. 緒 論

經濟의 成長과 더불어 環境問題가 오늘처럼 심각한 社會問題로 대두된 적도 없었다. 각종 產業場에서 나오는 廢棄物質이나 汚染物質은 경제성에 밀리어 결국 自然環境에 방출되는 경우가 많아지고 있다. 이러한 환경성 폐기물질과 오염물질을 再活用하거나 除去하기 위한 연구는 1970년대 이후 우리나라의 産業이 多様해짐에 따라 公害問題가 대두되면서부터 많이 進行되어 왔다. 그러나 이러한 일련의 연구는 産業의 종류에 따라 폐기되거나 오염되는 물질이 각각 다르기 때문에 우리가 經濟性 實用性을 고려하여 새로운 方法을 開發한다는 것은 쉬운 일이 아니었다.

종래는 이러한 시도가 주로 物理化學的 處理方法에 의하여 이루어 졌으나 근래에 와서는 微生物的 處理方法도 병행하여 많이 개발되고 있다. 특히 최근에는 遺傳子操作技術을 利用하여 한 종류의 微生物이 여러 種類의 毒性物質을 除去할 수 있는 슈퍼백도 있으며 또 環境성 폐기물중에서 炭水化物類의 有機物質을 分解하는 능력이 우수한 菌株의 開發에도 노력하고 있다. Pendrys¹⁾는 아스팔트나 시멘트같은 環境성 固形廢棄物을 嫌氣性 細菌에 의하여 분해 할 수 있다고 보고하였으며, Elgi 등은²⁾ *Acetobacterium woodii*에 의하여 tetrachloromethane을 dichloromethane으로 轉移시킬 수 있는 方法을 開發했다고 보고하고 있다.

微生物을 이용하여 汚染物質을 除去하는 것이 다른 방법과는 달리 不作用이 적고 비용도 低廉하다는 것을 쉽게 알 수 있다. 더우기 근래에 와서 여러 방향으로 개발되고 있는 immobilized biocatalysts를 利用하게 되면 다른 化學劑와 달리 한번 使用하고 버리는 것이 아니고 계속하여 反復하여 使用할 수 있어서 그 가치가 높이 평가³⁾되고 있다.

Immobilized biocatalysts라는 말은 固定化 酵素와 같은 단순한 構造를 가지거나 혹은 固定化 菌體처럼 복잡한 構造를 가진 生體觸媒物質로 사용되는 말이다. 이 말은 그동안 여러 방향으로 解析되어졌는데 1971년 미국의 New Hampshire에

서 있었던 제1회 國際酵素工學會議에서 처음으로 「酵素나 微生物이 物理的으로 制限된 狀態에 있거나 혹은 어떤 限定된 空間에 位置하면서, 그들의 觸媒活性을 지녀야 하고 또 이들을 反復하여 繼續的으로 使用할 수 있는 것을 immobilized biocatalysts」라고 定義한 바 있다.

이 immobilized biocatalysts는 單純酵素體系뿐만 아니라 共同補助因子를 함유하는 多種酵素體系이거나 혹은 復合酵素體系로 구성될 수 있다. 따라서 固定化 細胞는 단순한 한 反應에서부터 대단히 복잡한 反應에 이르기까지 여러가지 목적으로 사용될 수 있다. 따라서 이러한 immobilized biocatalysts을 이용하는 분야는 다양하여, 化學的 反應觸媒作用^{4,5)}에 이용되기도 하고 또 臨床病理 檢査에서 連續的으로 反復하여 사용하는데 좋은 方法⁶⁻⁸⁾으로 이용되고 있으며 또 工場의 廢水를 廉價로 處理^{9,10)}하기도 한다. 그리고 食品製造工業^{11,12)}이나 energy 生産¹³⁾ 등에 광범위하게 이용되고 있다.

Immobilized biocatalysts를 生産하는 方法은 여러가지 있으나 그 중요한 것을 몇가지 요약하면, 첫째, 物理的으로 吸着하거나 ion結合을 하거나 共有結合을 하는 방법으로 물에 不溶인 carrier에 微生物이나 酵素를 結合시키는 方法¹⁴⁾이 있고, 둘째, 2개 이상의 化學的 官能基를 가진 物質을 사용하여 微生物의 細胞나 酵素를 cross-linking시키는 方法¹⁵⁾이 있으며, 셋째, 半透過性 젤로 된 格子내에 entrapping시키거나 半透過膜내에 enclosing시키는 方法^{16,17)} 등이 있다.

Borchardt¹⁰⁾는 微生物을 固定化시켜 回轉板을 만들어 工場廢水를 工業的으로 處理한 것을 보고하였으며, Jack와 Zajic¹⁸⁾과 Ghose 및 Tyagi¹⁹⁾는 微生物을 안정하게 固定化시켜 그 微生物의 反應性을 높인 후에 여러개 연결한 bioreactor를 만들어 連續的으로 알코올을 醱酵시킬 수 있는 工程을 개발한 바 있다.

이와같이 immobilized biocatalysts의 개발에 따라 農産廢資源物質이나 製紙工場 澱粉工場에서 나오는 섬유소나 당질 등의 炭水化物을 分解시켜 糖의 原料로 사용하거나, 알코올 醱酵에 再利活用 수도 있다 또 有毒性物質이나 냄새를 除去하는 데도 이용할 수 있다.

따라서 본 연구는 저자들이 행한 바 있는 農産廢資源을 再利用^{20,21)}하고 또 汚染物質을 除去하기 위하여 사용이 편리하고, 反復하여 連續적으로 使用할 수 있는 低廉한 immobilized biocatalysts를 開發하기 위한 一連의 研究를 계획하게 되었다. 현재 우리 농촌에서 환경오염의 일부를 차지하고 있는 각종 固形廢棄物의 주성분이 섬유소인데 벧짚등 섬유소 물질은 쉽게 분해되지도 않고 또 害虫의 温床이 되고 있어 그 처리가 쉽지 않다. 또 澱粉工場에서 나오는 전분박이나 可溶性 澱粉液 등은 각종 미생물의 번식처가 되어 그 지역의 환경오염의 주범이 되고 있다. 이러한 環境性 炭水化合物의 廢棄物質을 除去하고 또 이들을 가수분해시켜 알코올을 생산한다면 일조이석의 효과를 얻을 수 있을 것으로 본다. 그래서 여기서는 우선 이러한 환경성 탄수화물로부터 알코올을 생산하기 위한 기초연구를 실시하였다. Ethanol의 生産性을 향상시키기 위하여 高温性 ethanol 醱酵 酵母를 固定化시키는 immobilized biocatalysts를 제조하여 이것을 장기간 보존하면서 glucose에 대한 ethanol 醱酵能力을 實驗해 본 결과 몇가지 유용한 성적을 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 酵母의 菌培養

본 연구에 사용한 효모는 高温性 ethanol 醱酵 菌인 *Saccharomyces cerevisiae* NFR1 408을 효모 보존용배지(yeast extract 5.0g, malt extract 5.0g, glucose 15g, KH₂PO₄ 2.5g, difco agar 10g/1,000ml)를 사용하여 121℃에서 20분간 살균하여 그 slant에 접종하여 30℃에서 3일간 배양하여 4℃에서 보존하였다. 이것을 필요시마다 보존용 액체 배지 10ml를 100ml 삼각플라스크에 넣고 여기에 접종하여 30℃에서 24시간 120rpm으로 진탕배양하여 배양효모로 사용하였다. 이때 배양액중의 菌體濃度는 4×10^8 cell/ml이었다.

2. Acrylamide의 重合에 의한 Immobilized Biocatalysts 製造

Polyacrylamide gel에 의한 固定化法은 필자⁶⁾가 보고한 방법과 Yamamoto²³⁾의 방법을 연결

변형시켜 제조하였다.

액체 진탕배양한 효모를 5,000×G에서 10분간 원심분리하여 효모균체를 얻고 이 습한 효모의 10g을 40ml의 증류수에 현탁하여 acrylamide 7.5g과 N,N'-methylene bis-acrylamide(BIS) 400mg을 첨가하여 용해시켰다. 이 혼합액에 5% β-dimethylamino propionitrile(DMAPN) 5ml과 1% K₂S₂O₈ 5ml를 가하여 35℃에서 30분간 重合反應을 시켰다.

이렇게 중합이 끝나면 彈力性이 강한 gel을 얻게 되고 이것을 적당한 bead 形態로 만들어 생리 식염수에 세척하여 4℃에서 보존하였다. 이렇게 제조된 효모균체는 물리적으로 性狀이 극히 안정하여 취급하기가 편리하다. 이때 單體로 사용한 acrylamide는 acetone으로 재결정시켜 사용하였다.

3. Magnetic Immobilized Biocatalysts 製造

Munro등²⁴⁾이 보고한 방법에 의하여, 효모균체 10g을 30ml의 증류수에 현탁시키고 여기에 4% (w/v) calcium alginate용액 20ml를 조심스럽게 저으면서 혼합하였다. 여기에 粒子의 크기가 50 μg보다 작은 magnetic powder 0.4g을 첨가하였다. 이 철분에 대한 대조구로 non-magnetic immobilized yeast를 제조하기 위하여 교질성 아철산염(페라이트)을 같은 양을 첨가하였다. 이 혼합용액을 30℃에서 보존하면서 피하주사바늘을 이용하여 0.05M calcium chloride용액속에 천천히 떨어뜨리면 bead가 생성된다. 이를 한시간 동안 방치하였다가 0.02M-calcium chloride 용액 속에서 보존하였다.

4. Ethanol 醱酵

본 실험은 여러가지 방법에 의하여 酵母로써 immobilized biocatalysts를 제조할 경우 이들의 ethanol 醱酵能力이 native yeast와 비교하여 어느 정도인지를 조사하기 위함이었기 때문에, 효모의 ethanol생산에 알맞는 glucose를 基質로 사용하였다.

10mM의 calcium chloride용액으로 0.25M의 glucose용액을 만들어 이 기질용액 100ml에 yeast extract 0.1g, malt extract 0.1g을 첨가하여

살균하였다. 이 배양기에 효모균체가 10g이 되도록 bead 양을 조정하여 30℃에서 발효시켰다.

5. Ethanol 測定

Ethanol은 1/8인치의 100cm porapak Q column이 부착된 Varian 3700 Gas Chromatograph를 사용하여 측정하였다.

試料 1ml에 2.5% m-HPO₃용액 1ml를 가하여 10분간 정치한후 원심분리하여 그 상등액 5μl를 syringe로 주입하였다. 이 시료는 110℃의 1m column을 통하여 flame ionization detector로 흘러 들어가며 이때 carrier gas로 N₂ 40ml/min을 사용하였다.

III. 結果 및 考察

1. Immobilized Biocatalysts의 Ethanol 醱酵能力

Immobilized biocatalysts의 特性을 이용하여 基質을 分解시키기 위하여서는 먼저 그 기질용액의 理化學的 性狀이 문제가 된다. 우리가 사용하는 환경성 폐기물질이나 오염물질은 일반 生産工程에서 사용하는 기질용액보다 粘度가 높거나 혹은 不溶性 異物質이 混入되어 있을 수 있기 때문에, 이런 경우 immobilized biocatalysts를 사용하면 한번 사용한 후 다시 回收하기가 어렵게 된다. 이러한 기질용액의 理化學的 性狀으로 인한 immobilized biocatalysts의 利用工程중에 문제가 될 수 있는 점을 고려하여 magnetic 물질을 carrier로 이용하여 immobilized biocatalysts를 製造하고자 시도하였다.

10mM의 calcium chloride용액으로 0.25M의 glucose용액을 만들어 이것을 기질로 하여 native yeast와 immobilized yeast를 발효시켰다. 이때 bead의 크기는 1mm정도로 해서 효모의 양을 기질용액 100ml에 10g이 되도록 그 양을 조정하였다. 매시간 별로 생성된 ethanol양을 gas chromatograph로 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

발효 후 1시간만에 immobilized yeast 3종류는 모두 거의 비슷하게 0.1M 정도의 ethanol을 생산하였으며 발효시간이 경과함에 따라 같은 비율로 급속도로 증가하였다. 발효 4시간까지 크게 증가하였던 ethanol의 생산량은 5시간부터는 그 생산

이 크게 둔화되었다. Native yeast와 Immobilized yeast간의 차이를 보면 native yeast가 immobilized yeast보다 일정하게 ethanol의 생성량이 많았으며, 특히 acrylamide重合法에 의하여 固定化된 것보다 발효 2~4시간에 0.1mol정도 차이가 있었다. magnetic immobilized와 non-magnetic immobilized 경우도 native yeast보다 0.05M 정도 발효능력이 낮았다. 그러나 magnetic과 non-magnetic간에는 차이가 거의 없었으며 이들은 polyacrylamide것 보다는 높았다.

Acrylamide의 重合에 의하여 효모를 entrapping시켰을 경우 다른 방법에 의하여 고정화된 것보다 고온에서의 ethanol발효조건에 적합하지 않은 것으로 보여진다. 즉 酵母가 acrylamide와 架橋劑 및 重合促進劑에 의하여 entrapping되어진 그 polyacrylamide gel의 化學的構造式²⁵⁾은 Fig. 2와 같다.

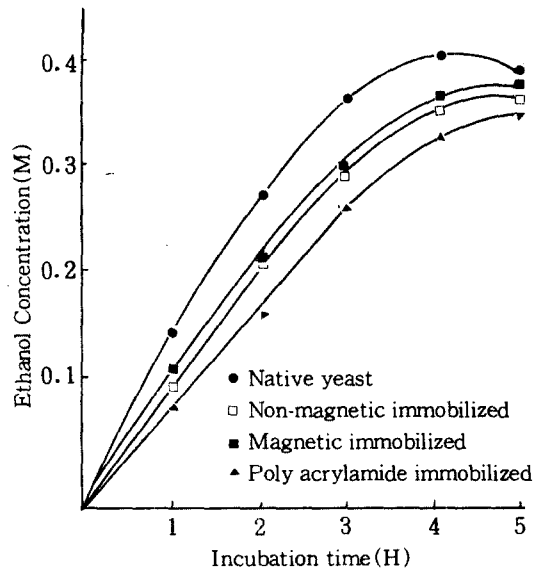


Fig. 1. Conversion of 0.25M of glucose by native and immobilized yeasts.

The native and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells were incubated with 0.25M of glucose in 10 mM CaCl₂.

The amount of yeast employed throughout corresponded to 10g of native yeast cells per 100ml of 0.25% of glucose. The ethanol concentration was analyzed as described in the text by gas chromatograph.

어서야 그 immobilized biocatalysts의 半減期가 되었다고 보고하였다. 또 필자⁶⁾의 경우도 glucose oxidase를 固定化시켜 bathch법으로 30일간 反復實驗을 했으나 그 活性에 變化를 볼 수 없었다. 이러한 사실들을 미루어 볼 때 固定化시킨 物質이 微生物의 細胞인지 精製된 酵素인지에 따라 活性이 다르게 나타나며, 또 미생물이라 하더라도 그 種類에 따라 細胞의 增殖과 酵素反應의 反應機作이 달라 酵素의 安定性이 문제가 되는 것으로 볼 수 있다. 이러한 사실을 좀 더 살펴보기 위하여 다음 실험을 하였다.

3. Immobilized yeast의 活性化로 ethanol 醱酵能力

Immobilized yeast를 장기간 보존하면서 batch법으로 ethanol의 醱酵能力을 보았을 때, 그 活性이 저하하는 현상을 규명하기 위하여 immobilized yeast를 활성화시켜서 그 醱酵能力을 조사해 본 결과 Fig. 4와 같다.

효모를 고정화시킨 후에는 바로 ethanol의 발효 능력에 이상이 없었다 하더라도 5일만에 그 활성이 급격히 떨어지는 것은, 공시된 효모에 사용한 monomer나 carrier가 適合한 것인지, 아니면 효소의 環境條件變化에 따라 ethanol의 醱酵酵素의 變化에 기인된 것인지를 확인하였다. 보존중인 immobilized yeast를 0.005M calcium chloride가 함유된 0.5%의 yeast extract와 0.05%의 $NH_4H_2PO_4$ 와 0.005%의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 들어 있는 배양기에서 30°C에서 48시간 활성화시켰다. 이것을 전과 같은 방법으로 발효를 시켰더니 모든 immobilized yeast에서 활성은 크게 증가하였다. 보존 2일부터 증가하기 시작하여 10~12일에 40~50%정도 증가하였다가, 15~17일부터 이것은 감소하면서 25일까지 감소는 완만하게 계속되었다. 그 후 30일까지는 최초의 활성에 비하여 15%정도 증가된 상태에서 더 이상의 변화는 없었다.

여기서 polyacrylamide에 의하여 entrapping된 효모가 시종 높은 활성을 보인 것은 역시 matrix 내가 효모의 증식에 유리했던 것으로 보여진다. 또 magnetic immobilized yeast가 2일에서 10% 정도 감소한 것은 초기의 세포분열에 있어 magnetic의 物理的 영향으로 볼 수 있다. 이러한

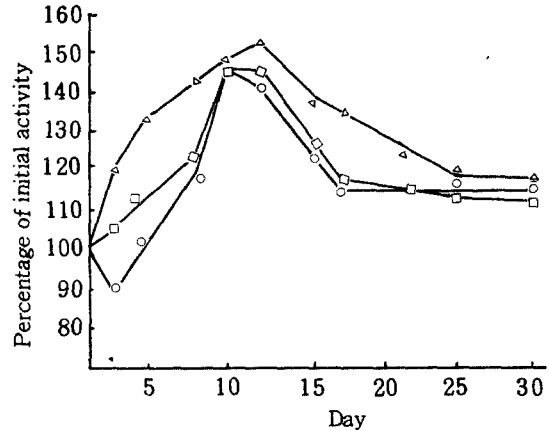


Fig. 4. Long-term operational stability of immobilized yeast with activation.

50g of immobilized yeasts were activated by incubating with 500ml of the nutrient media contained 0.5% of yeast extract, 0.05% of $NH_4H_2O_4$, and 0.005% of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in 0.005M of $CaCl_2$ at 30°C.

- Magnetic Immobilized Yeast
- Non-magnetic Immobilized Yeast
- △ Polyacrylamide Immobilized Yeast

immobilized yeast의 활성화 결과는 Ohlson 등²⁶⁾이 固定化된 微生物의 細胞는 다시 分裂하여 增殖되며 그 活性도 증가한다고 보고한 것과 일치하고 있다.

따라서 본 실험에 사용한 효모에 대한 固定化用 monomer나 carrier는 適合한 것으로 固定化는 잘 된 것으로 알 수 있었다. 단지 효모가 결핍된 영양 조건으로 인하여 ethanol 발효효소의 active site와 substrate complex가 잘 이루어지지 않은 것으로 생각된다.

4. 活性化된 Immobilized Yeast의 細胞數와 醱酵能力

Immobilized yeast를 활성화시켜서 ethanol을 발효시켜 보았더니 그 발효능력은 크게 증가함을 볼 수 있었는데 이러한 현상을 보다 구체적으로 규명하기 위하여 immobilized yeast를 다시 releasing시켜서 세포수와 ethanol의 발효능력을 측정한 결과는 Table 1과 같다.

Magnetic immobilized yeast를 활성화시킨 후에 Bükler counter chamber에서 세포수를 측

Talbe 1. Activation of manetic immobilized and non-magnetic immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells

	Magnetic immobilized yeast		Non-magnetic immobilized yeast	
	Cells/Bead	Activity (nMol/min/bead)	Cells/Bead	Activity (nMol/min/bead)
Before activation	$(2.9 \pm 0.25) \times 10^6$	0.19 ± 0.02	$(2.0 \pm 0.27) \times 10^6$	0.1 ± 0.01
After activation	$(1.3 \pm 0.03) \times 10^7$	33.9 ± 0.13	$(1.4 \pm 0.02) \times 10^7$	31.0 ± 0.18

정해 보았더니 활성화 이전에 비하여 44.8배 증가하였고, non-magnetic immobilized yeast에서는 48.3배 증가하였다. 또 발효능력을 측정해 보았더니 magnetic immobilized yeast에서 활성화후가 활성화전에 비하여 178배 증가하였고 non-magnetic immobilized yeast에서는 174배 증가하였다. 이러한 사실은 세포는 固定化되어어도 細胞分裂의 條件만 맞으면 크게 增殖하고 또 ethanol의 발효능력을 증가하는 것을 보여 주고 있었다. 다만 magnetic immobilized yeast가 細胞數에 있어서 non-magnetic immobilized yeast보다 약 10% 정도 적은 결과로 나타났으나 ethanol의 발효능력은 하등의 영향이 없었다.

따라서 immobilized biocatalysts를 開發하여 連續적으로 ethanol을 醱酵시킬 경우 immobilized yeast가 차후 增殖이 이루어 저서 酵素의 固定化보다 훨씬 효율적으로 生産工程이 이루어 질 수 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서 시도하고 있는 環境性 廢棄物質을 工業적으로 再活用하고 또 汚染物質을 除去할 경우 문제시 되고 있는 基質溶液의 강한 粘性和 混合되어 있는 不溶性 粒子의 異物質로부터 immobilized biocatalysts를 쉽게 分離할 수 있는 magnetic immobilized biocatalysts의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

IV. 結 論

環境性 炭水化物的 廢棄物質을 再活用하여 ethanol을 生産하기 위한 기초연구로써, *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 immobilized biocatalysts의 製造實驗을 하였던바 다음과 같은 結論을 얻을 수 있었다.

1. 高温性 ethanol 醱酵酵母를 magnetic immobilized, non-magnetic immobilized 그리고 polyacrylamide immobilized시킨 후에 native yeast와 ethanol 醱酵能力을 측정해 본 결과 native yeast와 3종의 immobilized yeast는 전 발효기간을 통하여 같은 경향으로 나타났다. 그러나 native yeast와 immobilized yeast의 ethanol 生成을 비교해 보면 native yeast는 polyacrylamide것보다 0.1M 정도 높았고 magnetic과 no-magnetic 것보다는 0.05M정도 높았다. 그러나 magnetic immobilized와 no-magnetic immobilized yeast 사이에는 어떤 차이도 발견할 수 없었다.

2. Immobilized yeast를 30일간 보존하면서 ethanol 발효능력을 조사해 보았더니 보존기간 초기부터 현저하게 감소되었다. 보존 10일에는 50% 정도 감소하였고 15일부터는 더 큰 감소없이 40% 정도의 활성으로 계속 유지되었다.

3. 보존중의 Immobilized yeast의 ethanol 발효능력이 저하된 현상을 규명하기 위하여, 본 실험에 사용한 효모에 대한 固定用 monomer나 carrier가 適合한 것이 있는지에 따라 固定化는 잘 이루어 졌는지를 살펴보았다. Immobilized yeast를 발효전에 活性化시킨후에, 발효를 시켜보니 전 보존기간을 통하여 ethanol의 발효능력은 증가하였다. 특히 보존 10~12일에서는 40~50%까지 증가하였고 25일 이후부터 30일까지 15%정도 증가된 상태가 계속되었으므로 固定化는 만족스럽게 製造된 것으로 보여진다.

4. Immobilized yeast가 活性化되면 ethanol의 발효능력이 증가하는 현상을 解析하기 위하여 이들을 다시 releasing시켜서 細胞數와 그 活性을 측정해 보았더니, magnetic immobilized yeast를 활성화시킨후의 세포수는 활성화시키기 전의 것

보다 44.8배 증가하였고 non-magnetic immobilized yeast 경우는 48.3배 증가하였다. 또 ethanol의 발효능력에 있어서는 magnetic immobilized yeast를 활성화 시킨것은 178배 증가하였고 non-magnetic것은 174배 증가하였다.

따라서 immobilized biocatalysts의 특성을 이용하여 基質을 分解시킬 경우 먼저 그 기질용액의 理化學的 性狀이 문제가 되는데 우리가 사용할 環境性 廢棄物質이나 汚染物質은 일반 生産工程에서 사용하는 基質溶液보다 粘度가 높거나 혹은 不溶性 異物質등이 混入될 수 있는 점을 고려하여 immobilized biocatalysts를 보다 편리하게 利用할 수 있도록 하기 위하여 magnetic 物質로써 固定化시킨 본래의 목적은 달성되었다. 다만 이 immobilized biocatalysts의 反應物性과 條件에 대한 기초적인 연구는 계속되어야 할 것이다.

參 考 文 獻

- 1) Pendrys, J.P. : Biodegradation of Asphalt Cement-20 by Aerobic Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 1357~1362, 1989.
- 2) Elgi, C., Tschan, T., Klasdair, S., Scholtz, R. and Leisinger, T. : Transformation of Tetrachloromethane to Dichloromethane and Carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*, *Applied and Environmental Microbiology* 2819~2824, 1988.
- 3) Ljungdahl, L.G. and Sgerod, D. : Mechanisms of Microbial Adaptation, *Extreme Environments*, 147~153, 1976.
- 4) Slowinski, W. and Charm, S.E. : Preparation of L-Glutamic acid by using *Corynebacterium gluamicum*, *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 977~985, 1973.
- 5) Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Chibata, I. : Fermentation of L-Asparaginic acid by Asparaginase of immobilized *Escherichia coli*, *Appli. Microbiol.*, 27, 886~894, 1974.
- 6) 金成器 : 固定化 Glucose Oxidase의 反復使用性 研究, *韓國生化學會誌*, 14, 353~361, 1981.
- 7) Kennedy, J.F., Barker, S.A. and Humphreys, J.F. : Determination Glucose of Serum by immobilized Glucose Oxidase, *Nature*, 261, 242~244, 1976.
- 8) Linfrmsn, L.R. and Rocchiccioli, C. : The Estimation of D-amino acid by immobilized Glucose Oxidase, *Nature*, 261, 242~244, 1976.
- 9) Cysewski, G.R. and Wilke, C.R. : Studies on the Process of Continual Fermentation with Immobilized Biocatalysts, *Biotechn. Bioeng.*, 19, 1125~1131, 1977.
- 10) Borchardt, J. A. : The Utilization of Immobilized Microorganism in a Waste Water Disposal Plant, *Biotechn. Bioeng. Symp.*, 2, 131~138, 1971.
- 11) Morisi, F., Pastore, M. and Viglia, A. : Entrapping Immobilization of Galactase purified from *Escherichia coli*, *J. Dairy Sci.*, 56, 1123~1129, 1973.
- 12) Cheethan, N.W.H. and Richards, G.N. : The Elimination of Dextrin in the Purifying Process of Sucrose by using Immobilized Biocatalysts, *Carbohydrate Res.*, 99~105, 1973.
- 13) Krouwel, P.G. and Braber, L. : Ethanol Production by Yeast at Supraptimal Temperatures, *Biotechn. Letters*, 1, 403~408, 1979.
- 14) Johnson, D.E., and Ciegler, A. : Determination of Invertase by Immobilized *Aspergillus oryzae* Spore of with DEAE-Cellulose, *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 384~390, 1969.
- 15) Jansen, E.F. and Olson, A.C. : Digestion of Casein using Papaing immobilized by Glutaraldehyde, *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, 221~228, 1969.
- 16) Bernfiel, P. and Wan, J. : The Attempt of Enzyme Immobilization by Enterapment Method, *Science*, 142, 678~682, 1963.

- 17) Kawashima, K. and Umeda, K. : Development of Immobilized Pyruvate Kinase by means of Radiocopolymerization, *Biotechn. Bioeng.*, 14, 599~605, 1975.
- 18) Jack, T.R. and Zajic, J.E. : Preparation of Bioreactors for Continual Fermentation by utilizing Immobilized Microorganism, *Advances in Biochem. Eng.*, 5, 125~130, 1977.
- 19) Ghose, T.K. and Tyagi, R.D. : Improving of Ethanol Fermentation process throughout Yeast cell Recycle Immobilized *Biotechn. Bioeng.*, 21, 1387~1393, 1979.
- 20) 金炳弘, 李貞允, 襄武, 金成器 : 農産廢資源의 微生物學的 利用에 관한 研究 (12報), 韓國産業微生物學會誌, 9, 65~69, 1981.
- 21) 金炳弘, 李貞允, 襄武, 金成器 : 農産廢資源의 微生物學的 利用에 관한 研究 (13報), 韓國産業微生物學會誌, 9, 71~75, 1981.
- 22) Kim, S : Studies on the Immobilization of Enzymes and Microorganism, *Korean J. of Appl. Microbiol. and Bioeng.*, 7, 1~8, 1979.
- 23) Yamamoto, T., Sato, T., Tosa, T. and Chibata, I. : Preparation of Immobilized Biocatalyst by polyacrylamide of *Pseudomonas putida*, *Biotechn. Bioeng.*, 16, 1589~1595, 1974.
- 24) Munro, P.A., Dunnill, P. and Lilly, M.D : Studies on the Magnetic Immobilized Biologically active Entities, *Biotechn. Bioeng.*, 19, 101~124, 1977.
- 25) Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T. : The Formation of Polyacrylamide gel by adding N,N'-Methylen bisacrylamide as bridge agency in the Immobilization of Microorganism, *Appl. Microbiol.*, 878~884, 1974.
- 26) Ohlson, S., Larsson, P.O. and Mosbach, K. : Cell Division and Biological Activity of Immobilized Microorganism, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 7, 103~110, 1979.