

포괄담체에 의한 *Zymomonas mobilis* 균체의 고정화

한면수* · 정동효

중앙대학교 산업대학 식품가공학과

Cell Immobilization of *Zymomonas mobilis* by Entrapment

Han, Myun-Soo* and Dong-Hyo Chung

Dept. of Food Science & Technology, College of Industrial Science,
Chung-Ang University, Seoul 150-756, Korea

Abstract— The immobilization characteristics of *Zymomonas mobilis* for ethanol production were examined. Four different strains of *Zymomonas mobilis* have been used for ethanol production. Among those, *Zymomonas mobilis* KCTC 1534 has been selected as the best strain for the highest ethanol productivity from glucose and sucrose. The optimum temperature and pH of the selected strain for ethanol production were 37°C and 5.0 respectively for both free and immobilized cells. When the cells were immobilized by the gel entrapment method, the immobilized cells could produce ethanol at a little higher temperature than free cells. Calcium alginate was selected as the best gel for immobilizing cells. The immobilized cells could maintain the viability of 80% in 10 weeks storage at 4°C in the medium with 2% calcium chloride. 20~25 hours of preincubation in 10% glucose solution was required for the activation of immobilized cells entrapped within calcium alginate gel.

최근 석유에너지 위기로 인하여 대체에너지 생산에 있어 생물학적 방법을 이용하고자 하는 연구(1)가 활발히 진행되고 있다. 이들 연구로는 발효에 의한 연료생산을 들 수 있는데 주로 생산성 향상에 목표를 두고 있다.

발효에 의한 에탄올생산성 향상을 위한 많은 연구로는 단위용적당 생산성 향상을 위하여 균체회수식 연속발효법(2), 균체회수식 감압발효법(3), 고정화 균체에 의한 발효법(4) 등이 연구, 보고되고 있다.

그 중 고정화 균체를 이용한 에탄올발효가 반응기내 균체의 농도를 높이 유지할 수 있는 장점을 지니 특히 많은 관심을 갖게 되었다.

균체의 고정화는 1977년 다공성 유리알에 효모를 고정화(5)시킨 것을 계기로 많은 고정화 방법과 균주들이 모색되고 있다. 균체를 고정화하는 방법으로는 포괄법(包括法), 가교법(加橋法), 흡착법(吸着法) 등이 있으며 에탄올의 발효공정에서는 주로 포괄법이

사용되고 있다.

포괄법은 미생물 균체의 물리적인 결합에 근거를 둔 고정화법으로써 담체로는 sodium alginate, κ -carrageenan, agar, polyacrylamide, carboxymethylcellulose, carboxyguargum, copolystyrenemaleic acid, phosphoguargum, furcellaran, cellulose sulfate, chitosan, pectic acid 등(6)을 사용하고 있다. 또한 이들 담체는 각종 미생물에 쉽게 적용할 수 있는 장점이 있어 많이 이용되고 있다.

지금까지 에탄올발효는 주로 *Saccharomyces cerevisiae*, *Sacch. sake*, *Sacch. uvarium* 등의 효모에 의존하여 왔다. 그러나 고생산성 에탄올발효를 실행할 경우에는 이들 효모의 생리, 생태적 특성으로 인해 기질저해와 에탄올저해를 받게되므로 생산성을 높이는 데는 한계점이 있다. 그러므로 음용이 아닌 에탄올을 생산하는데는 효모의 단점을 보완하는 측면에서 효모 이외의 균으로 에탄올생산을 시도하게 되었다.

효모 이외 에탄올을 생산할 수 있는 균주로 최근 주목을 받고 있는 *Zymomonas mobilis*(7)는 운동성의 그람음성인 혐기성의 단간균으로 생육적온은 30°C

Key words: Immobilized cell, *Zymomonas mobilis*, ethanol fermentation

*Corresponding author

부근이나 42°C 에서 15분간 열처리에도 생존율은 100%인 내열성, 효모와 비슷한 에탄올내성, 2%의 내염성, 12~13%의 고농도 당내성 및 응집성을 지니고 있다. 발효기질로써는 glucose, fructose, sucrose을 이용하며 효모를 대신하여 에탄올발효균주로 이용할 수 있고 육종을 통한 균주개발이 주로 연구되고 있다. 그러나 육종주를 사용할 경우 장시간 동안 발효를 수행하는 과정에서 또 다른 변이없이 계속 높은 활성을 유지할지가 의문사항으로 남아있게 된다. 그러므로 downstream에서는 유전적 성질이 안정하고 에탄올수율이 높은 균주를 택하여 연구하고자 한다.

이에 따라 본 연구에서는 에탄올발효력이 우수한 *Zymomonas mobilis* 균체를 선정하고자 하였으며, 이 균체를 각종 포괄담체에 고정화시켜 에탄올 발효 특성에 부합되는 적절한 담체를 찾고자 하였고, 이들 고정화 조건과 발효시의 고정화 균체의 안정성 여부를 검토하여 차후의 에탄올생산에 적용시키기 위한 일부의 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

미생물과 배양

본 연구의 공시균주는 한국과학기술연구원에서 *Zymomonas mobilis* KCTC 1534, KCTC 1535, 한국종균협회에서 *Zymomonas mobilis* KFCC 11336과 일본 동경대학 응용미생물연구소에서 분양받은 *Zymomonas mobilis* IAM 12663을 사용하였다.

보존배지는 표준배지와 합성배지의 조성(8)인 glucose 20g, yeast extract 10g, KH_2PO_4 2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g과 agar 20g을 수도물 1l에 녹인 후 pH를 5.0으로 조절하여 고온가압살균하였다.

전배양은 agar를 제외한 보존배지 3 ml에 종균 3 백급이를 접종하고 24시간 33°C 에서 배양하였다. 이 전배양액을 47 ml의 배지에 접종하고 48시간 본배양한 후 원심으로 집균한 후 살균된 생리식염수로 수회 세척시킨 균체를 고정화하였다.

고정화

Alginate : 고온가압살균 후 냉각시킨 4% sodium alginate(Junsei Chem. Co., Japan) 용액과 균체 현탁액(11.74 g/l)을 동량의 비로 혼합하고 이 혼합액을 22 gauge의 바늘이 부착된 실린지를 사용하여 살균된 2% CaCl_2 용액에 적하시켰다. 고정화 균체의 형상은 반응기내에서의 여러 저해조건을 고려하여 적당한

크기로 많이 사용되고 있는 직경 약 2.5~3.0 mm의 구형으로 조제(9)하였다. 이를 4°C 에서 하룻밤 숙성시키고 10% glucose 농도의 에탄올 생산배지에서 활성화시킨 후 모든 실험에 사용하였다.

κ -Carrageenan : κ -Carrageenan 겔은 온도변수에 의해 조제하였다. 즉, κ -carrageenan(Sigma Co., USA)을 생리식염수에 4%(w/v)되게 넣고 가열용해시켜 고온가압살균한 후 45°C 수욕조에 보관하였다. 여기에 45°C 로 보온된 균체 현탁액(11.74 g/l)을 동량 혼합시켜 살균된 petri dish에 3 mm 두께로 분주하여 냉각고형화(9)하였다. 고형화된 겔을 3×3×3(mm) 크기의 정육면체로 자른 후 살균된 2% KCl 용액에 넣어 4°C 에서 하룻밤 숙성시키고 10% glucose 농도의 에탄올 생산배지에서 활성화시킨 후 모든 실험에 사용하였다.

Agar : 4% agar(Difco Co.) 용액을 κ -carrageenan 고정화와 같은 방법으로 고형화시켜 3×3×3(mm) 크기로 자른 후 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0)에 하룻밤 숙성(9)시키고 10% glucose 농도의 생산배지에서 활성화시킨 후 모든 실험에 사용하였다.

에탄올발효

에탄올 생산배지는 보존배지의 기질농도를 조절한 후 CaCl_2 를 0.3%가 되게하여 고온가압살균하였다. 이 경우는 기질과 CaCl_2 를 별도로 분리하여 살균한 후 혼합하였다.

에탄올발효는 실리콘 발포마개를 부착시킨 300 ml Erlenmeyer flask에 에탄올 생산배지(이하 생산배지) 90 ml와 고정화 균체 10 ml를 넣어 작용량 100 ml가 되게 한 후 왕복진탕배양기(100 strokes/min)에서 진탕발효시켰다.

기질의 종류, 농도, 온도, pH와 발효시간 등은 제어하고자 하는 조건으로 조절하여 발효시간에 따른 에탄올함량, 잔당량과 유출균체량의 변화를 조사하였다.

분석

균체량 : 균체량은 흡광도와 건조균체량 사이의 표준농도(10)로부터 계산하였다. 즉, 발효액 1 ml에서 살균된 증류수로 3회 원심세척하고 상정액을 제거시켜 얻은 균체를 4°C 에서 건조시킨 후 증류수 1 ml를 가하여 용해시키고 일정한 배수로 희석한 후 spectrophotometer(Shimadzu, UV-240)의 파장 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음에 건조균체량은 균체를

원심침전(7,000×g, 5 min)한 후 105°C 건조기에서 24시간 이상 건조하여 항량을 칭량하였다.

생균수는 발효액을 일정량 희석하여 보존배지에 도말평판하여 30°C에서 40시간 배양시킨 후 생성된 집락수로 산출하였다.

Alginate 고정화 균체는 0.2 M citrate buffer(pH 5.7)에 용해(11)시켜 흡광도로 균체량을 측정하였다. κ-Carrageenan(12)과 agar(13) 고정화 균체는 변법으로 0.85% 살균 생리식염수를 가하고 50°C에서 진탕하여 용해시켜 살균증류수로 원심 세척한 후 흡광도로 균체량을 측정하였다.

당 : 발효액 1 ml를 원심침전시켜 얻은 상정액에서 glucose와 fructose는 DNS법, sucrose는 phenol-sul-

furic acid법으로 정량(14)하였다.

pH : 회분발효의 pH는 발효액을 원심침전시킨 후 얻은 상정액을 측정하였다.

에탄올 : 에탄올은 발효액 1 ml에서 원심침전시켜 얻은 상정액을 일정배수로 희석한 후 isopropanol을 표준으로 첨가하여 Table 1과 같은 조건의 gas chromatography를 사용하여 분석(15)하였다.

결과 및 고찰

최적균주와 기질의 선택

Zymomonas mobilis KCTC 1534, KCTC 1535, KFCC 11336과 IAM 12663 균주를 glucose, fructose와 sucrose 각 10% 기질에 대하여 30°C에서 20시간 진탕발효시킨 후 균체의 비증식속도, 에탄올농도와 에탄올생산율을 측정된 결과는 Table 2와 같다.

Zymomonas mobilis KCTC 1534 균주는 10% glucose에서 비증식속도 0.14 h⁻¹, 에탄올농도 4.68%(w/v), 에탄올생산율 0.48 g/g로 가장 우수한 에탄올생산력을 나타내었다. 한편 fructose는 *Zymomonas mobilis* KFCC 11336이 에탄올농도 3.28%(w/v), 에탄올수율 0.33 g/g로 우수하였으며, sucrose는 *Zymomonas mobilis* KFCC 1534가 에탄올농도 3.80%(w/v), 에탄올수율 0.39 g/g로 다른 균주에 비하여 발효력이 우

Table 1. Conditions of gas chromatography operation for ethanol analysis

Gas chromatography	Hwlette Packard
Detector	Flame ion detector (FID)
Column material	Porapak Q (80~100 mesh)
Control temperature	Oven 200°C Detector 220°C Injector 210°C
Carrier gas	Helium
Injection volume	1 μl

Table 2. Ethanol production capabilities of various *Zymomonas mobilis* strains

Strains	Substrates Conc. 10% (w/v)	Specific growth rate (h ⁻¹)	Ethanol	
			Conc. (% w/v)	Yield (g/g)
<i>Zymomonas mobilis</i> KCTC 1534	Glucose	0.14	4.68	0.48
	Fructose	0.09	2.98	0.30
	Sucrose	0.14	3.80	0.39
<i>Zymomonas mobilis</i> KCTC 1535	Glucose	0.15	4.54	0.46
	Fructose	0.08	2.87	0.29
	Sucrose	0.14	3.12	0.32
<i>Zymomonas mobilis</i> KFCC 11336	Glucose	0.17	3.92	0.40
	Fructose	0.17	3.28	0.33
	Sucrose	0.15	3.59	0.37
<i>Zymomonas mobilis</i> IAM 12663	Glucose	0.12	3.98	0.41
	Fructose	0.04	1.08	0.11
	Sucrose	0.12	2.67	0.27

*KCTC: Korean Collection for Type Culture

*KFCC: Korean Federation of Culture Collections

*IAM: Institute of Applied Microbiology (Tokyo University, Japan)

수하였다. 따라서 *Zymomonas mobilis* KCTC 1534를 고정화하였고 glucose를 기질로 사용하였다.

최적 고정화조건

고정화 균체농도 : 2%의 alginate, κ -carrageenan과 agar 수용액 1l에 건조균체량 2.35g, 5.87g, 11.74g, 23.48g의 균체를 각각 가하여 고정화한 후 33°C에서 20시간 진탕발효시켜 에탄올 함량을 조사한 결과는

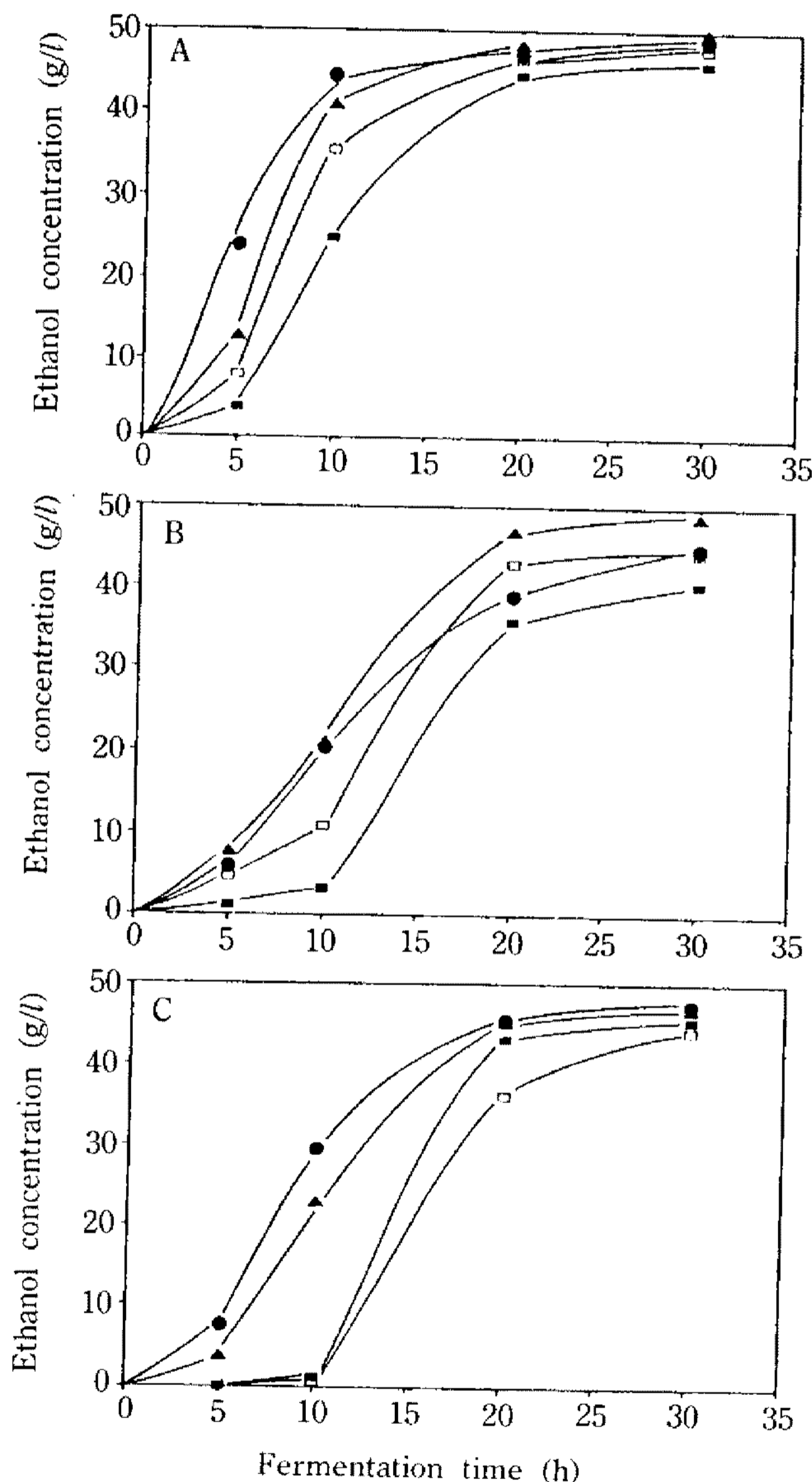


Fig. 1. The effect of initial cell mass of *Zymomonas mobilis* used for immobilization on ethanol fermentation.

A: alginate, B: κ -carrageenan, C: agar
 —■— : 2.35g (dry cell weight)/l(gel)
 —□— : 5.87g (dry cell weight)/l(gel)
 —▲— : 11.74g (dry cell weight)/l(gel)
 —●— : 23.48g (dry cell weight)/l(gel)

Fig. 1과 같다. 각 포괄담체 공히 균체의 농도가 높을수록 초기발효가 왕성하게 일어났으며 발효 종료 시간인 20시간에 이르러서는 고정화시킨 균체 농도 11.74 g/l까지는 에탄올함량이 증가하였고 23.48 g/l에서는 약간 감소되었다. 한편 온도 변수에 의하여 겔이 형성되어지는 κ -carrageenan과 agar는 높은 온도에서 균체가 일부 사멸되는 관계로 초기에 포괄되는 균체량이 alginate보다 적어 초기 발효가 늦게 일어나고 있었다. 따라서 고정화시키는 균체의 농도는 건조균체량 11.74 g/l gel의 농도가 적합하였고 균체가 많이 포괄되어야만 생산성을 높일 수 있는 것은 아니라는 결과를 알 수 있었다. 한편 Pyun 등(16)과 Chung 등(17)이 보고한 결과도 alginate에 효모를 고정화시킬 때 겔내에 포괄되는 균체의 농도를 생성되는 에탄올 함량으로 비교하면 일정 균체농도까지는 균체량이 많은 경우 에탄올생성량이 증가되나 그 이상의 균체농도에서는 포괄되는 균체농도에 커다란 영향이 없이 생성되는 에탄올함량이 비슷하다고 하였다. 그리고 세균을 고정화시킨 본 결과도 이를 입증하고 있다.

고정화 담체농도 : 포괄담체의 농도를 1%에서 4%까지 각각 조정하여 균체(11.74g dry cell/l)와 혼합하고 고정화시킨 겔을 33°C에서 20시간 진탕발효시켜 유출된 균체량, 에탄올농도와 잔당량을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 담체의 종류에 관계없이 담체농도가 높을수록 유출되는 균체량은 감소되었으며 에탄올농도도 감소됨을 나타내었다. 이는 담체의 농도가 높으면 겔의 견고성이 증가되므로 겔내의 틈새가 조밀하여져서 물질전달속도가 떨어지기 때문인 것으로 해석(14)되었다. 이 결과에 따라 고정화 균체의 견고성과 에탄올생산성을 고려하여 포괄 담체농도는 2%로 정하였다.

균체의 안정성

유리 균체 : 생산배지를 10% glucose, pH 5.0으로 조정하고 발효온도를 27°C에서 43°C까지 변화시키면서 20시간 진탕발효시킨 후 *Zymomonas mobilis*의 에탄올생성량, 잔당량과 균체량을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 에탄올 함량으로 보아 *Zymomonas mobilis*는 37°C까지 에탄올발효력을 유지하였으며 주입된 glucose는 30°C에서 37°C까지는 거의 전량이 소모되었고 증식된 균체량은 30°C에서 최대량이었다. 따라서 *Zymomonas mobilis* KCTC 1534 에탄올발효 최적온도는 33°C이었으며 37°C까지는 에탄올발효가 가능하였다.

Table 3. Effect of gel matrix concentration on cell immobilization

A kind of matrix		Gel matrix concentration (%)			
		1.0	2.0	3.0	4.0
Ca-alginate	Ethanol conc. % (w/v)	4.2	4.26	3.94	3.84
	Effluent cell (g/l)	0.90	1.08	0.66	0.85
	Residual glucose (g/l)	1.91	1.21	4.90	5.28
κ-Carrageenan	Ethanol conc. % (w/v)	4.2	4.2	4.14	4.06
	Effluent cell (g/l)	3.36	2.87	3.18	2.58
	Residual glucose (g/l)	1.67	1.96	2.40	3.67
Agar	Ethanol conc. % (w/v)	4.32	4.3	4.0	3.97
	Effluent cell (g/l)	1.72	2.02	2.69	2.52
	Residual glucose (g/l)	1.76	1.61	3.50	4.63

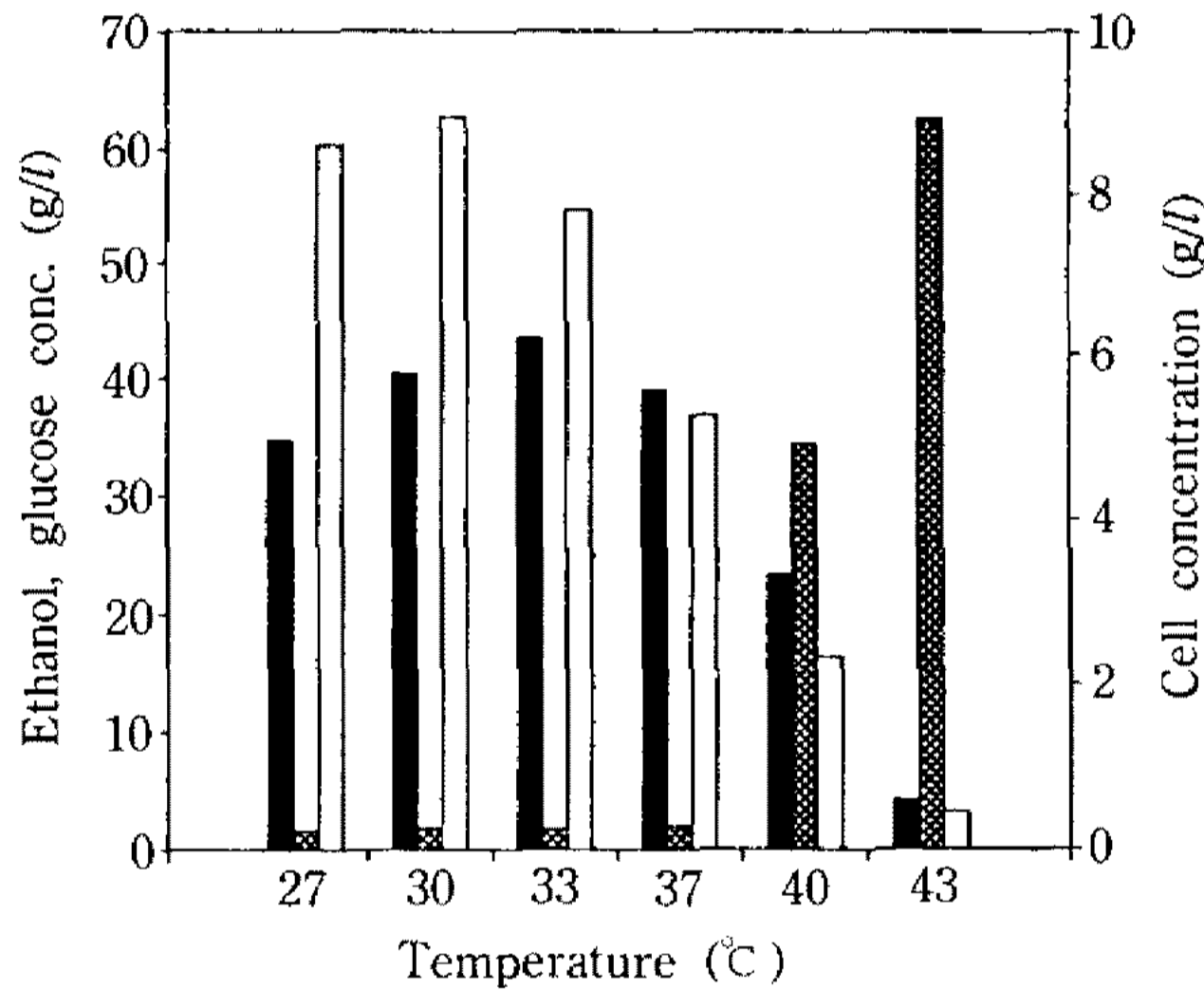


Fig. 2. Effect of temperature on ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* KCTC 1534.

■: ethanol, ▨: glucose, □: cell

Meyer와 Van vuuren(19), Goma와 Laudrin(20)은 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988이 에탄올생성에 미치는 온도의 영향을 알아본 결과 32°C에서 최대 에탄올함량을 나타내었다고 보고한 바 있고 Doelle과 Lyness(21)는 35°C라고 보고되어 균주에 따라 약간 상이하였다.

생산배지의 초기 pH의 영향을 알아보기 위하여 glucose 농도는 10%로 고정하고 33°C에서 초기 pH 값을 4.0에서 7.0까지 변화시켜 진탕발효시킨 결과는 Fig. 3과 같다. 에탄올함량은 pH 5.0에서 pH 7.0까지는 큰 차이가 없었으며 주입된 glucose는 pH 5.0에서 pH 7.0까지는 거의 전량이 소모되었고 증식균체량은 pH 5.0에서 최대의 증식량을 보였고 pH 7.0까지는 비슷하게 증가되는 경향을 보였다. 따라서 *Zymomonas*

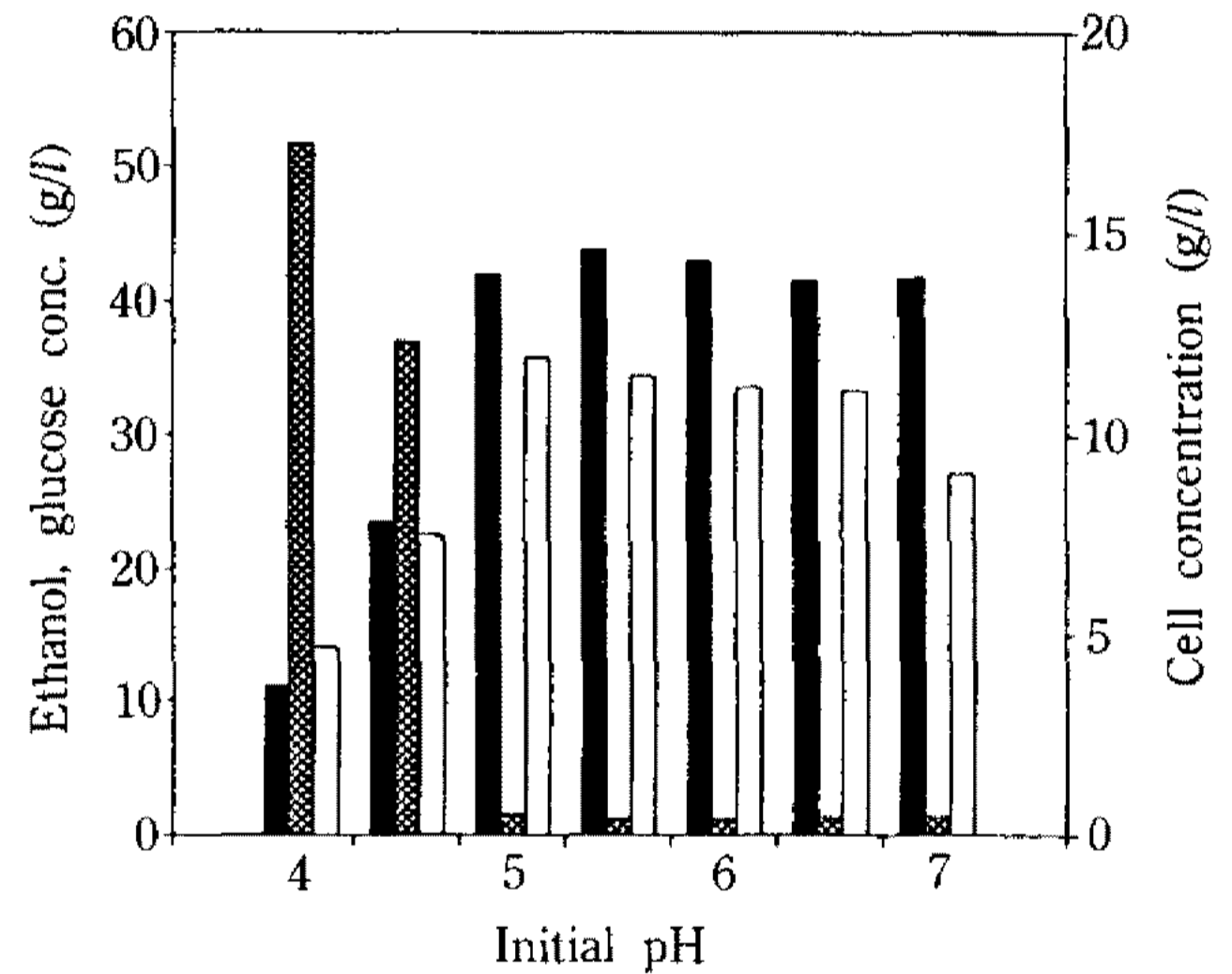


Fig. 3. Effect of initial pH on ethanol fermentation.

■: ethanol, ▨: glucose, □: cell

mobilis KFCC 1534의 에탄올발효 최적 pH는 5.0이며 pH 5.0에서 pH 7.0까지는 발효안정성을 유지할 수 있었다.

Meyer와 Van vuuren(19), Lawford 등(22)은 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988의 에탄올발효에 미치는 pH의 영향을 30°C에서 72시간 발효 후 생성된 에탄올함량으로 비교한 바 에탄올생성량이 pH 5.6에서 pH 6.6까지는 비슷하였고 pH 4.8 이하에서는 감소되었다고 보고한 바 있어 본 결과와 비슷하였다.

Alginate 고정화 균체: Alginate 고정화 균체를 사용한 에탄올발효의 온도안정성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 발효온도 27°C에서 43°C까지는 에탄올함량이 40~50 g/l이었고, 33°C에서 최대 에탄올함량을 나타내었으며 주입된 glucose는 27°C부터 43°C

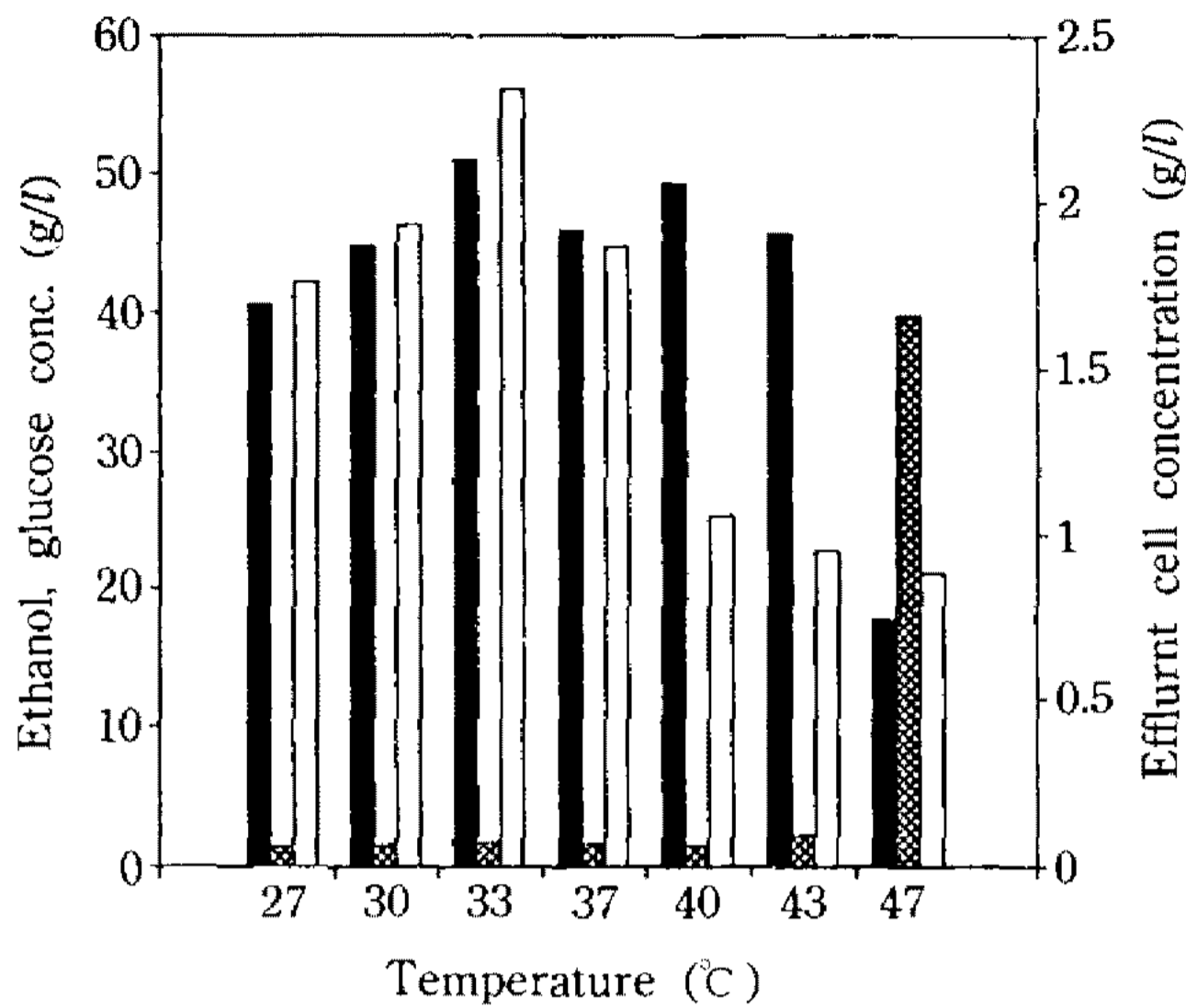


Fig. 4. Effect of temperature on ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* entrapped in alginate.

■: ethanol, ▨: glucose, □: cell

까지는 거의 전량이 소모되었고 유출되는 균체량은 27°C 에서 33°C 까지는 증가되어 33°C 에서 최대 유출량을 보였다. 따라서 본 *Zymomonas mobilis* KCTC 1534의 alginate 고정화 균체에 의한 에탄올발효의 최적온도는 33°C 이었고 43°C 까지 발효가 가능하였다.

Bajpai와 Margarities(23)가 alginate에 고정화시킨 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 균주는 에탄올발효에서 최적온도는 37°C 이었고 40°C 까지는 발효가 가능하였다고 보고한 바 본 균주와는 약간의 차이가 있었다.

생산배지의 초기 pH가 alginate 고정화 균체의 에탄올발효에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 5 와 같다. pH 4.5에서 7.0까지 pH 변화에 따른 큰 차이없이 40~50 g/l 정도를 나타내었으며 pH 5.0에서 최대 함량을 보였으며 주입된 glucose는 pH 4.0을 제외한 실험한 모든 범위에서 거의 전량이 소모되었고 유출균체량의 경우 산성영역의 pH 4.5 이하에서는 균체가 증식에 저해를 받아 담체 외부로 유출되는 균체량이 감소되었으나 pH 5.0 이상에서는 유출균체량이 증가되었다. 한편 전조건에서 발효 종료액 pH는 4.0에서 5.0이었다. 따라서 본 *Zymomonas mobilis* KCTC 1534 alginate 고정화 균체의 에탄올발효시 최적 pH는 5.0이었으며 pH 5.0 이상에서는 에탄올발효가 가능하였다.

Bajpai와 Margarities(23)가 alginate에 고정화시킨 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988은 에탄올발효가 pH 4.4에서 pH 6.0까지 가능하였다고 보고된 바 있

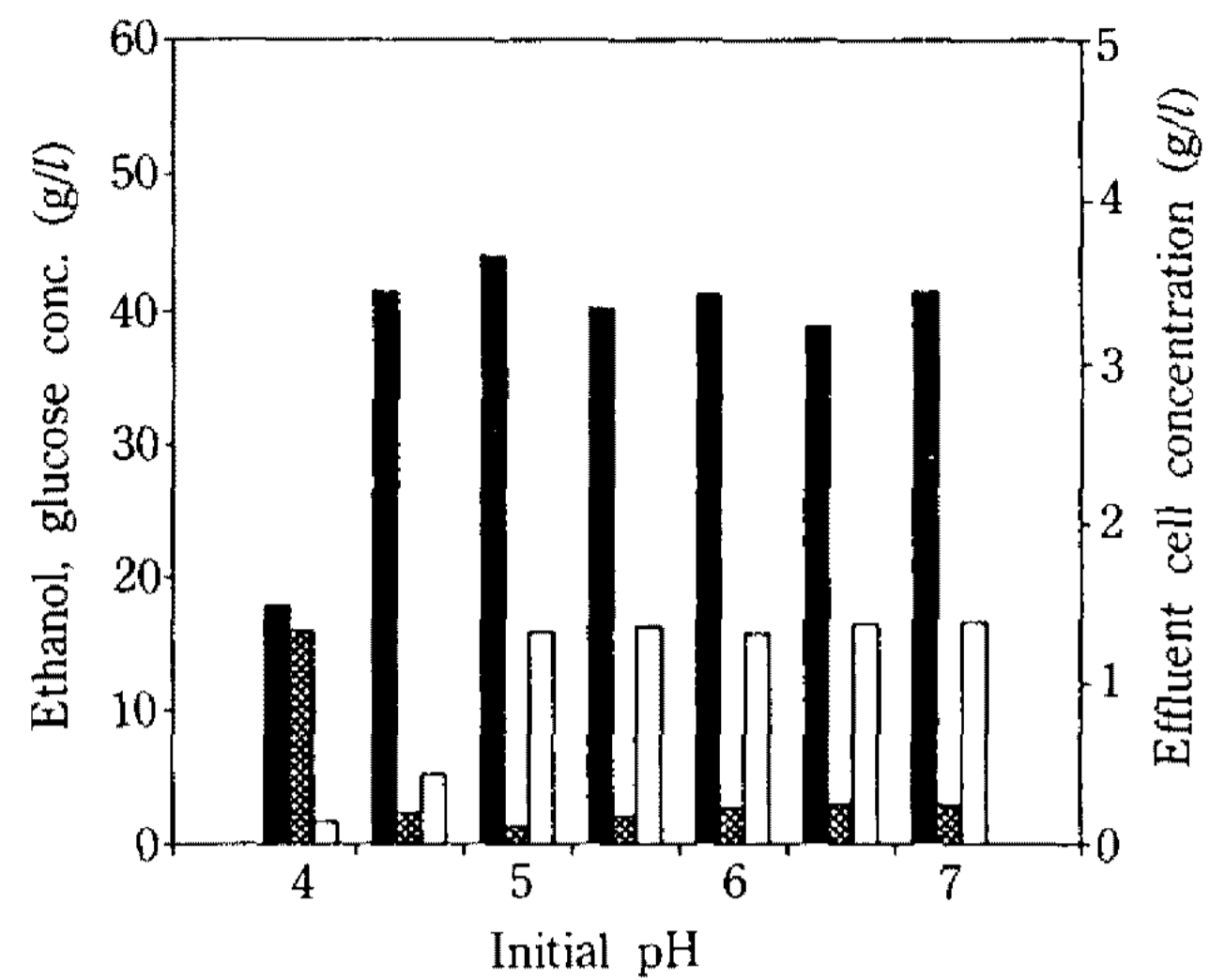


Fig. 5. Effect of initial pH on ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* KCTC 1534 entrapped in alginate.

■: ethanol, ▨: glucose, □: cell

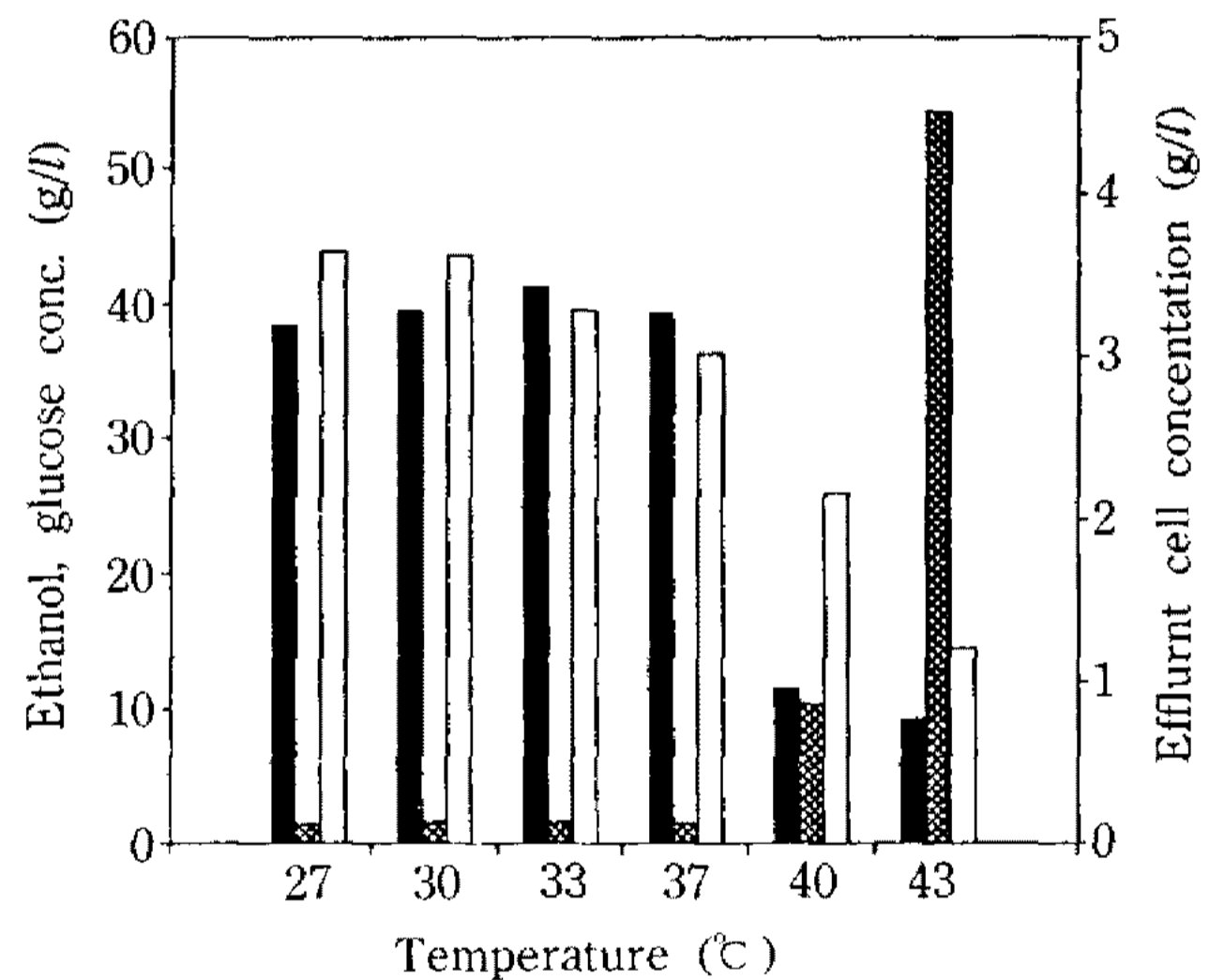


Fig. 6. Effect of temperature on ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* entrapped in κ-carrageenan.

■: ethanol, ▨: glucose, □: cell

으나 본 *Zymomonas mobilis* KCTC 1534의 고정화 균체가 pH 이용 범위가 약간 넓게 나타났다.

κ-Carrageenan 고정화 균체 : κ-Carrageenan 고정화 균체를 사용한 27~43°C 의 에탄올발효에서 온도의 안정성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 27°C 에서 33°C 까지는 에탄올함량이 38~42 g/l이었고 33°C 에서 최대 에탄올함량을 나타내었으며 주입된 glucose는 27°C 에서 37°C 까지는 거의 전량이 소모되었고 유출균체량은 27°C 에서는 최대유출량을 보였고 온도가 증가함에 따라 상대적으로 유출량이 감소되었다. 따라서 κ-carrageenan 고정화 균체에 의한 에탄올발효

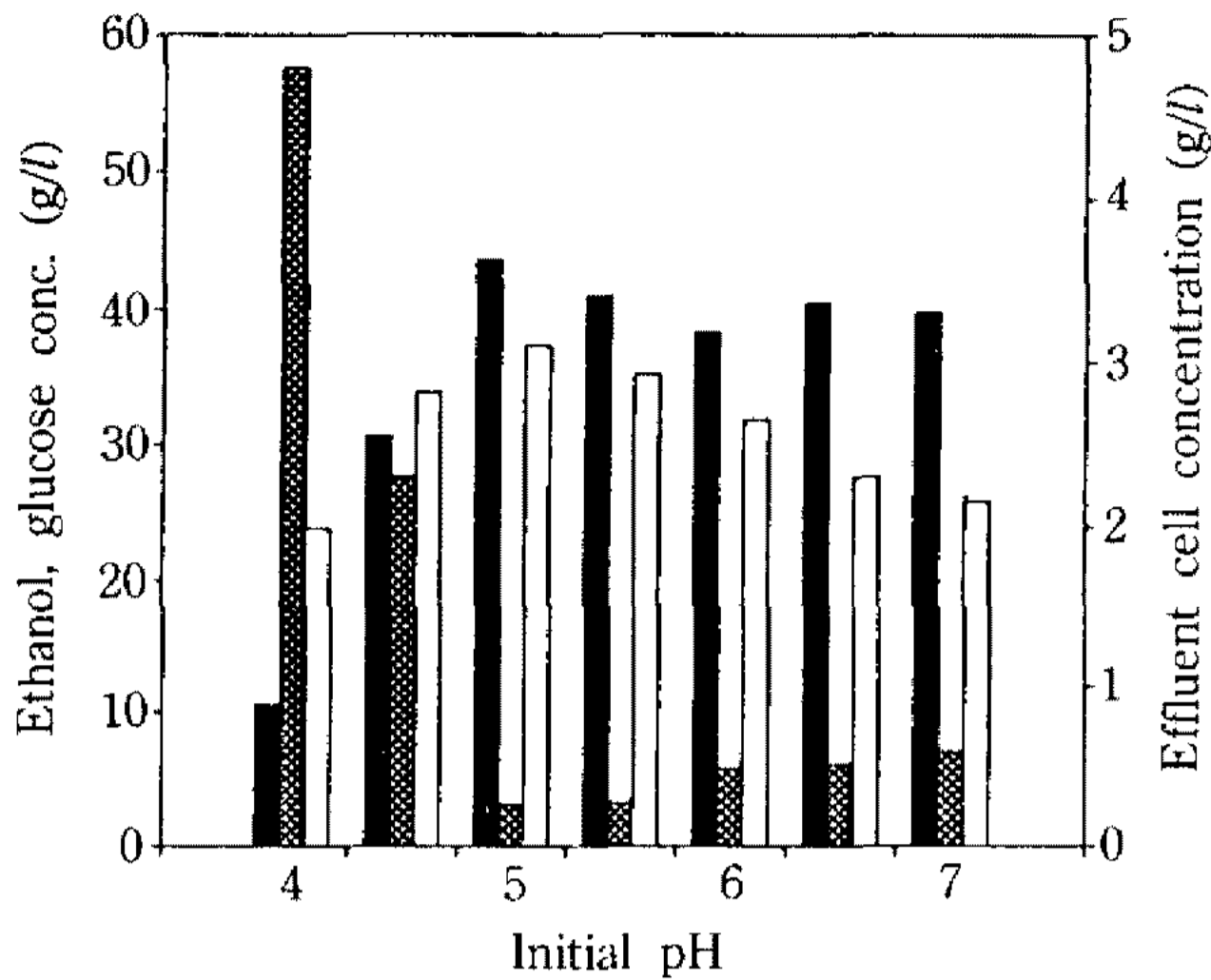


Fig. 7. Effect of initial pH on ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* entrapped in κ -carrageenan. ■: ethanol, ▨: glucose, □: cell

의 최적온도는 33°C 이었고 37°C 까지 에탄올 발효에 사용할 수 있었다.

생산배지의 초기 pH가 κ -carrageenan 고정화 균체의 에탄올발효에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. pH 5.0에서 최대 에탄올함량을 보였고 pH가 7.0까지 초기 pH가 증가됨에 따라 에탄올함량은 약간 감소되었으나 pH 4.5 이하로 떨어질 경우에는 최대 에탄올함량의 70% 이하로 감소되었다. 투입된 glucose는 최적 pH인 5.0에서 거의 전량이 소모되었으며 유출균체량의 경우 pH 4.5 이하는 κ -carrageenan 겔 외부로 유출되는 균체량이 감소되었으나 pH 5.0 이상의 범위에서는 다시 유출균체량이 증가되었고 pH가 7.0까지 증가됨에 따라 유출량은 약간 저하되었다. 따라서 κ -carrageenan 고정화 균체를 사용한 에탄올 발효의 최적 pH는 5.0이었고 pH 5.0에서 pH 7.0까지 에탄올생산을 할 수 있었다.

Agar 고정화 균체 : Agar 고정화 균체를 사용한 에탄올발효에서 온도의 안정성을 알아보기 위하여 27~43°C 에서 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 27°C 에서 40°C 까지는 에탄올함량이 40~45 g/l이었고 33°C 에서 최대 에탄올함량을 나타내었으며 투입된 glucose는 27°C 에서 40°C 까지는 거의 전량이 소모되었고 유출되는 균체량은 27°C 에서는 최대로 유출되었고 온도가 증가됨에 따라 상대적으로 유출량이 감소되었다. 따라서 agar 고정화 균체에 의한 에탄올발효의 최적온도는 33°C 이었으며 40°C 까지 에탄올발효가 가능하였다.

생산배지의 초기 pH가 agar 고정화 균체의 에탄

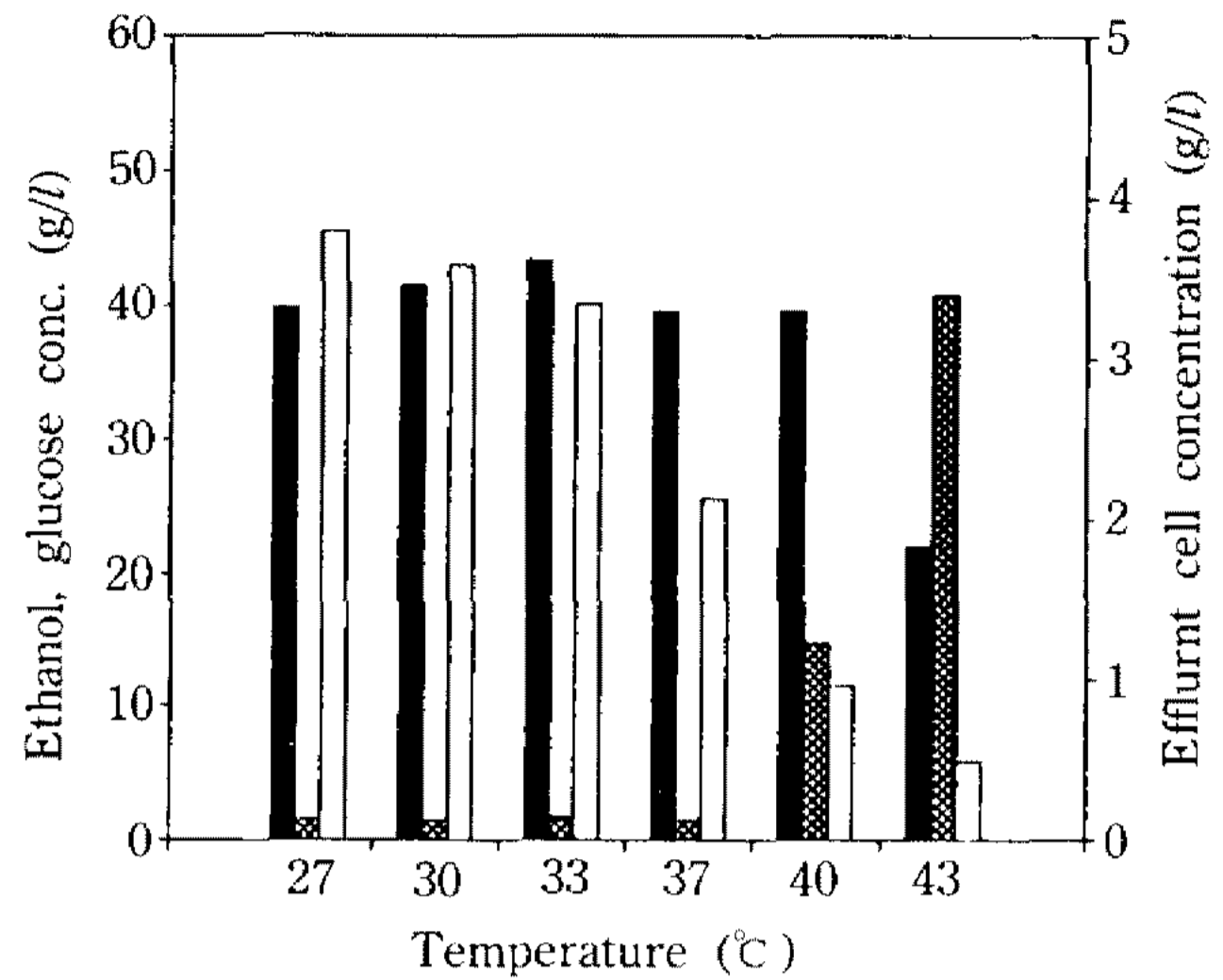


Fig. 8. Effect of temperature on ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* KCTC 1534 entrapped in agar.

■: ethanol, ▨: glucose, □: cell

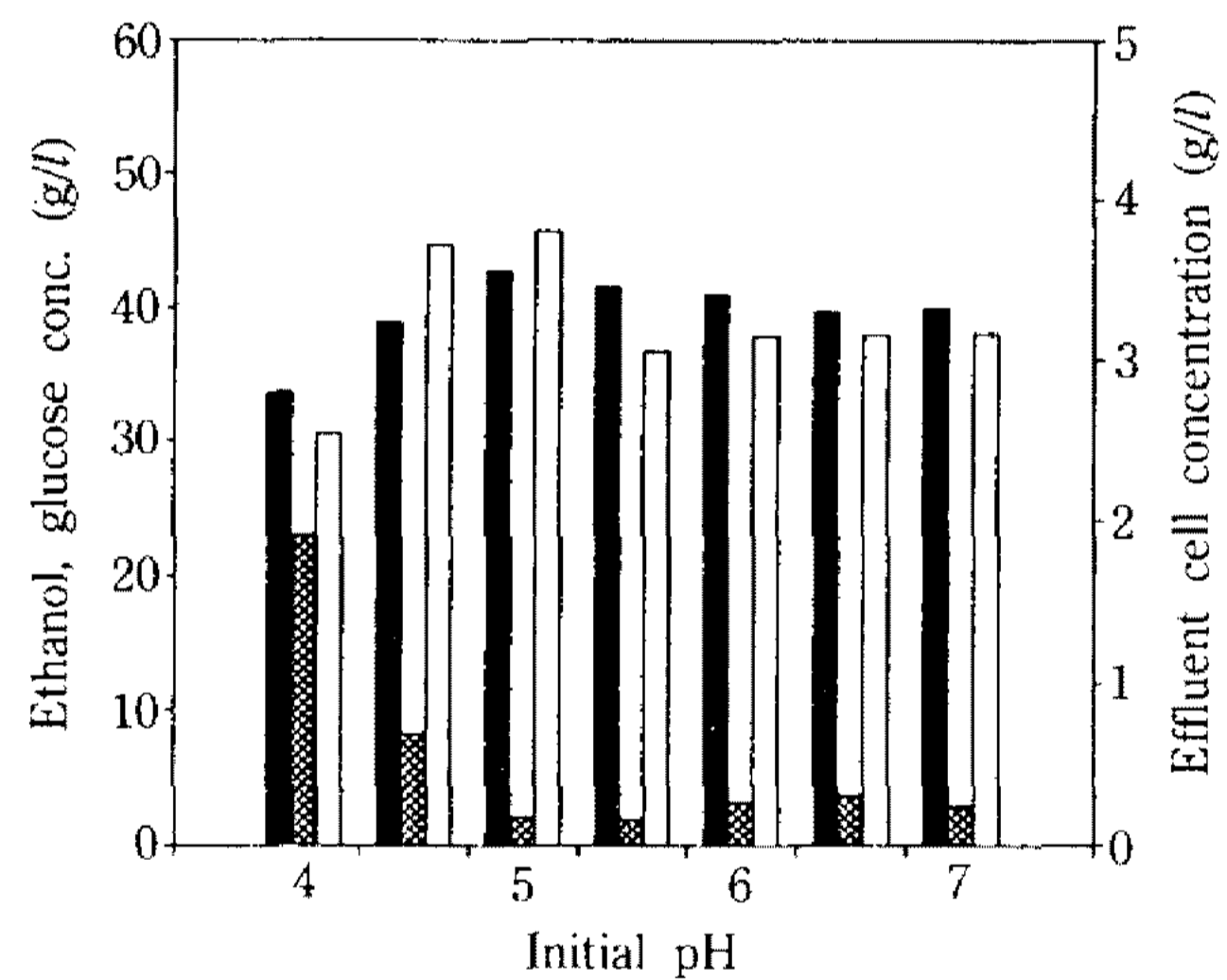


Fig. 9. Effect of initial pH on ethanol fermentation *Zymomonas mobilis* entrapped in agar.

■: ethanol, ▨: glucose, □: cell

올발효에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. pH 5.0에서 최대 에탄올함량을 나타내었으며 투입된 glucose는 pH 4.5 이하에서는 균체의 증식에 저해를 받아 agar 겔 외부로 유출되는 균체량이 감소되었으나 pH 5.0 이상의 범위에서는 유출균체량이 증가되었고 pH가 다시 증가함에 따라 유출량은 약간씩 저하되었다. 따라서 agar 고정화 균체를 사용한 에탄올발효의 최적 pH는 5.0이었고 pH 5.0에서 pH 7.0까지 발효가 가능하였다.

이상의 결과로 보아 *Zymomonas mobilis*는 포괄담체에 고정화시킴으로써 고온에서 유리 균체보다 안

Table 4. Ethanol production from 10% glucose medium by free and immobilized cells

A kind of matrix	Ethanol concentration	
	% (w/v)	Effluent cells in the fermentor (g/l)
Free cells (Control)	4.49	8.96
Calcium alginate ^a	4.49	1.91
κ -Carrageenan ^b	4.37	3.62
Agar ^b	4.47	3.58

^aBead type gel of 3 mm in diameter

^bCubic type gel of 3×3×3 mm

정하게 에탄올발효를 시도할 수 있었으며 특히 alginate에 고정화시킨 경우 약 43°C 까지 높은 열안정성을 지니고 있었다. 그러나 생산배지의 pH는 고정화 균체나 유리 균체가 서로 비슷한 양상을 보여 pH 5.0이 최적조건이었고 pH 5.0 내지 pH 7.0이면 발효가 가능하였다.

고정화 담체의 선정

Alginate, κ -carrageenan과 agar 고정화 균체를 10% glucose 농도의 생산배지(pH 5.0)로 33°C 에서 20시간 진탕발효시킨 후 에탄올농도와 유출되는 균체량을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 겔내 균체가 성장하면서 증가되므로 내부에 존재하고 있던 균체가 담체 외부로 유출되었다. Alginate 고정화 균체보다 κ -carrageenan과 agar 고정화 담체가 유출되는 균체량이 많았으나 3종류의 고정화 담체간의 에탄올생성량에서는 커다란 차이를 보이지 않았다. 그러나 고정화 균체를 이용할 경우는 겔 외부로 유출되는 균체가 적고 생산성이 좋은 담체를 선정하여야 하므로 sodium alginate를 적합한 고정화 담체로 선정하였다.

Nakanishi와 Yokotsuka(24)도 효모를 alginate, κ -carrageenan, agar와 pectin 등에 고정화한 결과 담체간의 에탄올생성량에서는 별다른 차이가 없었으나 alginate가 다른 담체보다 유출균체량이 적어 포괄 담체로 최적이었다고 보고한 바 있다. 그러나 κ -carrageenan과 agar는 온도변수에 의하여 겔이 형성되기 때문에 겔강도가 약하고 유출되는 균체량이 많으며 겔 모양을 구형으로 만들기가 어렵고 고정화시 균체가 고온에서 변성되거나 사멸하여 실제 고정화되는 생균수가 적은 단점을 나타내었다. 특히 κ -carrageenan 겔은 산성에서는 강도가 약하여 장시간 연속배양이 곤란하며 지속성도 떨어진다. 반면 alginate 겔은 위의

Table 5. Effect of immobilized bead volume on ethanol fermentation

Packing rate (%)	Ethanol concentration (g/l)	Conversion rate of glucose (%)
2.5	43.5	98.51
5	44.6	96.29
10	47.3	96.88
15	46.8	98.69
20	47.5	96.98
25	45.1	98.78
30	46.0	96.96

두 겔에 비하여 생산값이 저렴하고 겔강도가 강하여 비교적 장기간 사용할 수 있으며 대량생산하여 공업화 설비에 이용이 가능하다. 또한 유리 균체와 비슷한 에탄올 생성량을 나타내고 있고 균체의 고정화시 담체를 구형으로 만들기가 용이하여 물질전달을 원만하게 할 수 있는 장점을 지니고 있다.

Alginate 고정화 균체의 영향

고정화 균체 충전율 : 에탄올발효에서 생산배지에 대한 고정화 균체의 비율인 충전율이 발효과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생산배지 대 고정화 균체의 충전율을 2.5~30%로 조사한 결과는 Table 5와 같다.

충전율 10, 15%와 20%에서 에탄올함량은 각각 47.3, 46.8, 47.5 g/l이었고 기질전환율은 약 97%로 나타났다. 그러나 25% 이상의 충전율에서는 에탄올함량이 감소되었다. 이는 기질인 glucose 일부가 충전율이 높은 경우 다량인 균체의 성장에 이용되는 것으로 기인한다고 사료된다. 따라서 고정화 균체의 충전율은 10%에서 20% 범위에서 사용하는 것이 무난하다고 보아 충전율 10%로 발효과정을 수행하였다.

Calcium chloride의 농도 : Calcium chloride는 alginate 겔의 안정제(26)로 사용되고 있다. CaCl₂ 농도가 에탄올발효시 생성되는 에탄올함량과 alginate 겔에 포괄된 내부 균체의 유출에 미치는 영향을 알아보기 위하여 CaCl₂ 농도를 0.1~0.5%까지 조정된 결과는 Table 6과 같다.

생산배지의 CaCl₂ 농도는 0.3%까지는 에탄올생산에 큰 영향을 미치지 않았고 유출균체량도 감소되었다. 그러나 0.4% 이상에서는 유출균체량은 감소되었으나 에탄올함량과 기질전환율이 떨어졌다. 이러한 결과에 준하여 생산배지의 CaCl₂ 농도를 0.3%로 하여 에탄올

Table 6. Effect of calcium chloride concentration on continuous ethanol production using immobilized *Zymomonas mobilis* in alginate

CaCl ₂ (%)	Time (h)	Effluent cell (g/l)	Ethanol (g/l)	Conversion rate of glucose (%)
Control	20	3.7	45.7	96.5
0.1	20	3.6	45.3	95.3
0.2	20	3.4	44.9	96.1
0.3	20	2.0	45.0	96.1
0.4	20	1.5	38.0	85.7
0.5	20	0.9	33.2	80.6

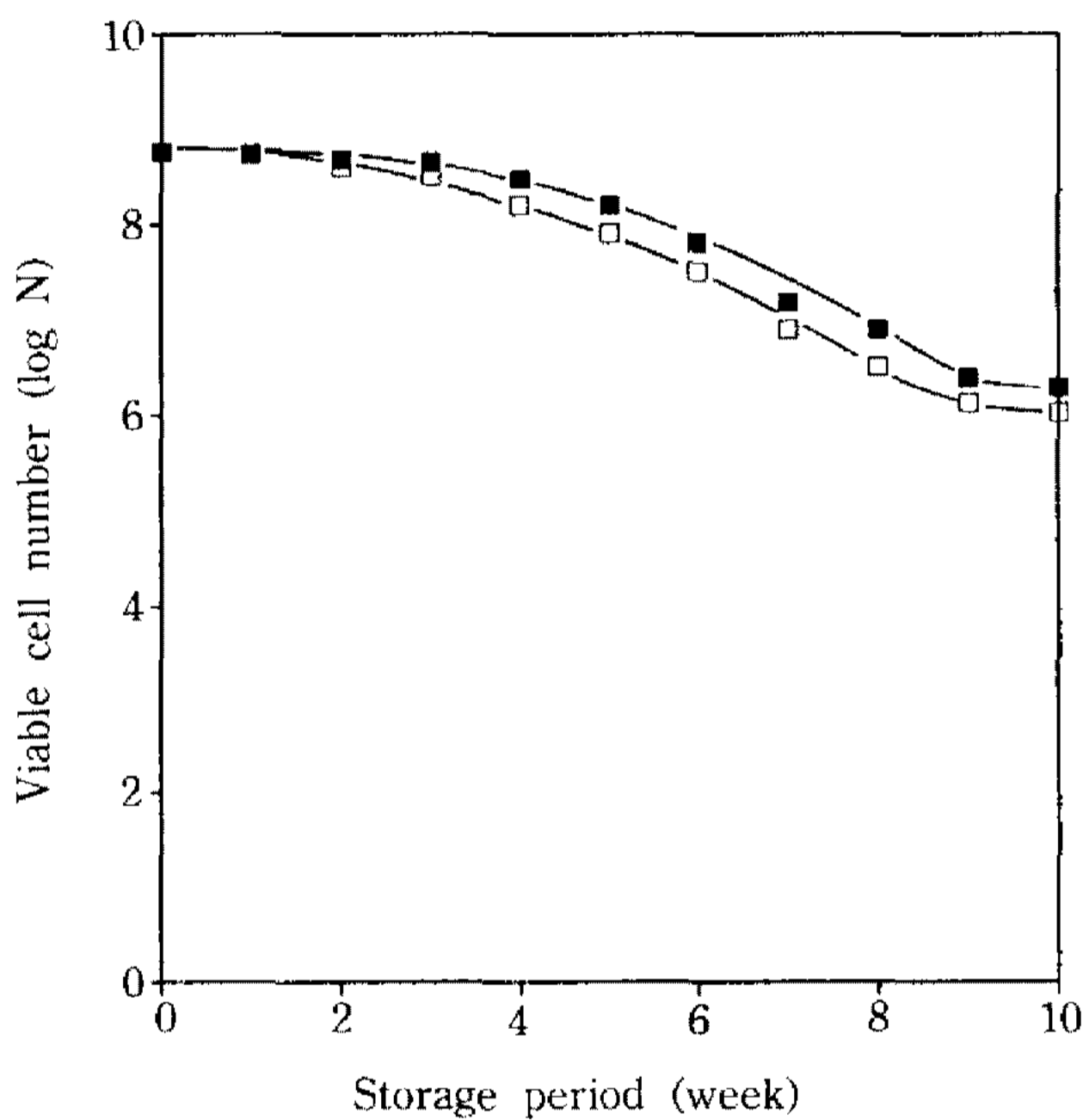


Fig. 10. Storage stability of alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* in preservation medium at 4°C.

—■— : cultivation medium with 2% CaCl₂
 —□— : 2% calcium chloride solution

발효과정을 수행하였다.

Bajpai 등(27, 28)도 생산배지의 CaCl₂ 농도 0.1%에서 0.3%까지는 에탄올함량과 기질전환율에서 큰 차이는 없었지만 0.4%부터는 이들값이 저하되어 발효 종료시간이 연장되었다고 하였다. 그리고 0.3%의 경우는 유출균체량이 감소되며 겔의 안정성도 장시간 유지할 수 있어 고정화 균체를 사용하는 경우 이상적인 안정제의 농도로 사용할 수 있었다고 보고한 바 있다.

고정화 균체의 저장안정성 : 2% CaCl₂ 용액과 보존배지(2% CaCl₂ 첨가)에 alginate 고정화 균체를 50% 비율로 넣어 4°C에 보관하면서 매주 각 생균수를 조사한 결과는 Fig. 10과 같다. 보존배지에 보관한 고

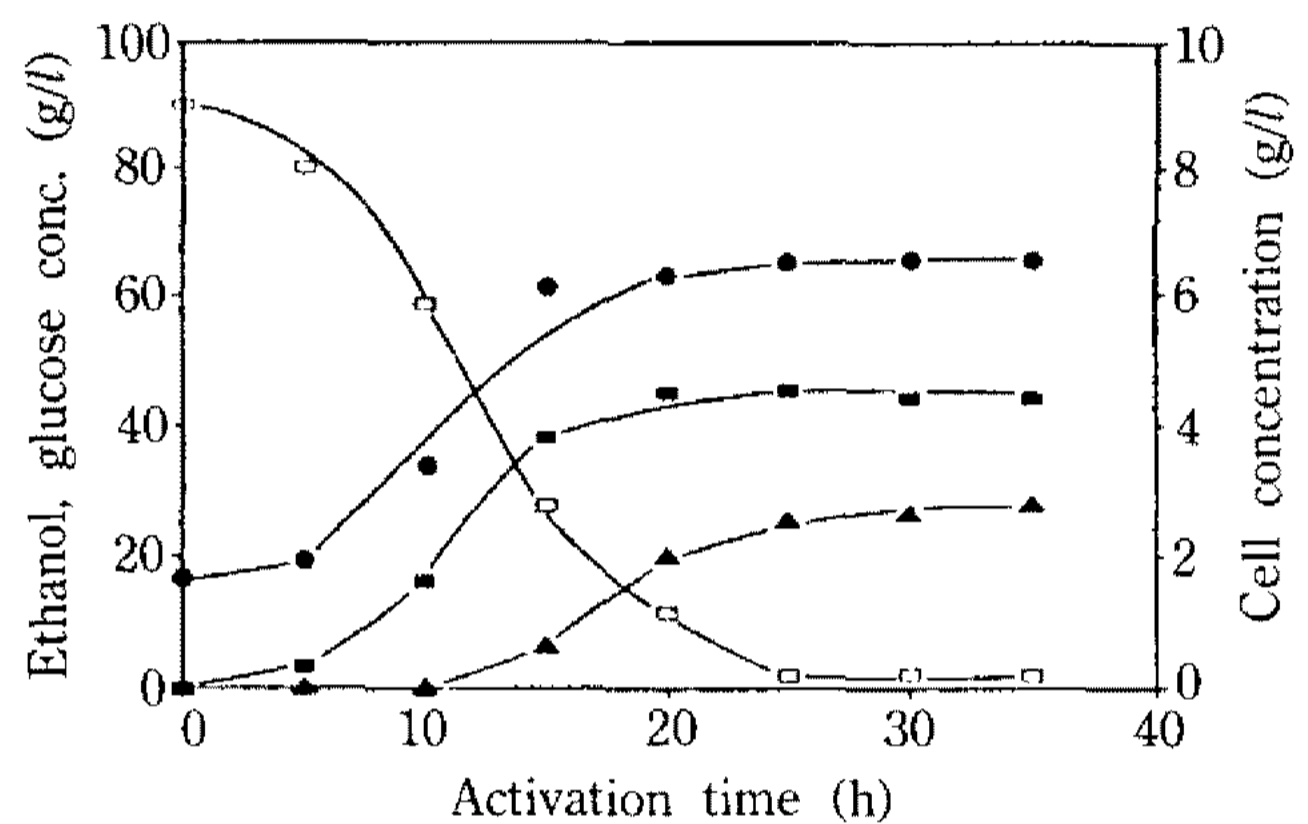


Fig. 11. Activation of immobilized *Zymomonas mobilis* by calcium alginate.

—■— : ethanol, —□— : glucose, —△— : effluent cell, —●— : immobilized cell

정화 균체가 CaCl₂ 용액에 보관한 고정화 균체보다 생존력이 약간 우수하였다. 이 경우 생균수는 5주일까지 5%, 10주일까지는 10%씩 저장기간이 경과함에 따라 감소되었다. 따라서 alginate에 고정화된 균체는 장기간 보존하면서 사용이 가능하였다.

또한 유사한 예로 Jang 등(29)이 β-galactosidase를 alginate에 고정화하여 약 40일 동안의 보관에서 효소활성의 95% 이상을 유지할 수 있었다고 보고한 바 있다.

고정화 균체의 활성화

숙성된 고정화 균체를 생산배지(10% glucose, pH 5.0)의 10%로 넣고 33°C에서 30시간 동안 회분발효시키면서 시간별로 에탄올함량, 잔당량, 유출균체량 그리고 겔내 균체량을 측정된 결과는 Fig. 11과 같다. 발효시간에 따른 겔내 균체량은 glucose 기질의 생산배지에서 20시간까지 대수적으로 증가하였으나 그 이후는 거의 완만하게 증가되어 약 30시간 후에 초기 겔내 균체량의 약 7배 정도인 약 0.8 g dry cell/ml

gel에 달하였다. 그리고 겔내 균체량의 증가에 따라 alginate 겔은 팽윤되어 지름이 최초 약 2~3 mm에서 활성화된 후에는 약 1.5배 가량 증가되었다. 활성화시키는 동안 유출되는 균체량은 15시간까지는 완만히 증가되었으나 그 이후부터 20시간까지는 대수적으로 증가되었으며 30시간에 이르러 휴지기에 이르렀고 이때 증식된 균체량이 활성화 겔에 포괄된 전체 균체량의 약 2/3까지 도달하게 되었다. 이들 유출균체량은 겔로부터 유출되어 나오는 균체와 더불어 유출된 균체가 계속된 증식을 한 것으로 여긴다. 생성되는 에탄올함량은 15시간부터는 급속히 그 생성량이 증가되었고 20시간에 이르러 발효가 완료됨을 보여주었으며 그 이후에는 약간 감소되었다. 한편 잔당량은 발효 종료시간인 20시간 내지 25시간에 이르러서는 거의 전량이 소모되어 기질의 고갈이 일어나므로 발효의 휴지상태에 이른 것으로 사료된다. 한편 활성화 전, 후의 겔표면과 단면을 광학현미경을 통하여 관찰한 결과, 활성화 시간이 지남에 따라 겔표면에 균체가 몰려있었고 겔표면의 이완현상도 관찰되었다. 이 결과에 따라 20시간 내지 25시간 활성화시킨 고정화 균체를 회분발효에 사용하였다.

효모 *Pachysolen tannophilus*를 alginate에 고정화시킨 Byun 등(16)의 보고와 *Zymomonas mobilis*를 고정화시켜 fructose로부터 에탄올을 생성한 Baratti 등(30)의 보고에서도 약 20시간 내지 25시간 정도면 고정화 균체의 활성화가 일어난다고 보고한 바 있어 본 결과와 비슷한 경향을 보이고 있다.

요 약

세균을 고정화시켜 에탄올을 생산하기 위하여 4종류의 *Zymomonas mobilis*를 사용하였다. 이들 중 glucose와 sucrose로부터의 에탄올생성능이 가장 우수한 것으로 *Zymomonas mobilis* KCTC 1534를 선별하였다. 선별된 균주의 고정화 특성을 살펴본 결과 발효 최적온도와 pH는 각각 33°C 와 5.0으로 고정화 균체나 유리 균체에 대하여 큰 차이가 없었다. 그러나 최대 발효 가능온도는 유리 균체가 37°C 인데 비하여 alginate, κ-carageenan, agar에 고정화했을 때 각각 43, 37, 40°C로서 균체를 고정화할 경우 유리균체에서 보다 높은 온도에서도 발효가 가능함을 확인하였다. Alginate 고정화 균체는 2% alginate 농도에 건조균체량 11.74 g/l가 최적이었다. 고정화 균체의 활성화는 10% glucose 농도의 생산배지에서 20~25시간을 요

하였고, 4°C 에 보관할 경우 calcium chloride 2%를 가한 중균배지에서 약 4주간은 전균체량의 90% 이상이, 10주간에는 80% 이상의 균체가 생존하였다.

참고문헌

- Dellweg, H. 1989. Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I. Energy from renewable resources, Pp. 3. In H.J. Rehm and G. Reed (ed), *Biotechnology: A Comprehensive Treatise*, Vol. 3, VCH, Germany.
- Margaritis, A. and P. Bajpai. 1982. Continuous ethanol production from *Jerusalem artichoke* tubers. *Biotech. Bioeng.* **24**: 1473-1482.
- Ramalingham, A. and R.K. Finn. 1977. The vacuum process: a new approach to fermentation alcohol. *Biotech. Bioeng.* **19**: 583-589.
- Nojima, S. 1983. The development of continuous alcohol fermentation by immobilized living cells. *Chemical Economy & Engineering Review* **15**: 16-21.
- Navarro, J.M. and G. Durand. 1977. Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. *Eur. J. Appl. Microbiology* **4**: 243-254.
- Klein, J. and K.D. Vorlop. 1985. Immobilization techniques-cell, Pp. 204-212. In Murray Moo-Young (ed), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2. Pergamon Press, Oxford.
- Tonomura, K. and H. Yanase. 1988. Ethanol production by bacteria. *Chemistry and Biology* **25**: 177-185.
- Swings, J. and J.D. Ley. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Reviews* **41**: 1-46.
- Kierstan, M.P.J. and M.P. Couhnlán. 1985. Immobilization of cells and enzymes by gel entrapments, Pp. 39-48. In J. Woodward (ed.), *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.
- Marison, I.W. 1988. Growth kinetics in biotechnology for engineers, p. 184. In A.A. Scragg (ed), *Biological Systems in Technical Processes*, Alam. H.
- Hilge-Rotmann, B. and H.J. Rehm. 1990. Comparison of fermentation properties and specific enzyme activities of free and calcium alginate entrapped *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 54-58.
- Godia, F., C. Casas and Sola. 1987. Mathematical modelization of a packed bed reactor performance with immobilized yeast for ethanol fermentation. *Biotech. Bioeng.* **30**: 836-843.
- Chibata, I., T. Tosa and T. Sato. 1986. Methods of cell immobilization Pp. 217-229, In A.L. Der-

- main and N.A. Solomon (ed). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
14. Martin, F. Chaplin. 1986. Monosaccharides, Pp. 2-3. In M.F. Chaplin and J.F. Kennedy (ed.), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.
 15. Swaine, D.E. and A.J. Daugulis. 1989. Liquid residence time distributions in immobilized cell bioreactor. *Biotech. Bioeng.* **33**: 604-612.
 16. Pyun, Y.R., O.J. Won and H.J. Choi. 1987. The conversion of D-xylose to ethanol by immobilized *Pachysolen tannophilus*. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* **3**: 170-175.
 17. Han, M.S., S.D. Ha and D.H. Chung. 1991. Studies on the immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* **19**: 390-397.
 18. Saeki, A. 1990. Vinegar production using immobilized *Acetobacter aceti* cells entrapped in calcium alginate gel beads. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **37**: 191-198.
 19. Meyer, L. and H.J.J. Van vuuren. 1982. Production of ethanol from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **4**: 253-256.
 20. Goma, G. and I. Laudrin. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*: Effect of temperature on cell growth, ethanol production and intracellular ethanol accumulation. *Biotechnol. Lett.* **4**: 537-542.
 21. Doelle, H.W. and E. Lyness. 1981. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol. Lett.* **3**: 549-554.
 22. Lawford, H., P. Holloway, and A. Ruggiero. 1988. Effect of pH on growth and ethanol production by *Zymomonas*. *Biotechnol. Lett.* **10**: 809-814.
 23. Bajpai, P.K. and A. Margaritis. 1986. Effect of temperature and pH on immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol. *Biotech. Bioeng.* **28**: 824-828.
 24. Nakanishi, K. and K. Yokotsuka. 1987. Production of white table wine from koshu grape using immobilized yeast. *Nippon Shokuhin Kokyo Gakkaishi* **34**: 362-369.
 25. Nagashima, M., M. Azuma, S. Noguchi and K. Inuzuka. 1984. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotech. Bioeng.* **26**: 992-997.
 26. Brodelius, P. and E.J. Vandamme. 1989. Immobilized cell system, Pp. 435. In H.J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnology: A Comprehensive Treatise* Vol. 7a, VCH, Germany.
 27. Bajpai, P., J.B. Wallace and A. Margaritis. 1985. Effects of calcium chloride concentration on ethanol production and growth of immobilized *Zymomonas mobilis*. *J. Ferment. Technol.* **63**: 199-203.
 28. Bajpai, P.K. and A. Margarities. 1984. Effect of calcium chloride on the growth and ethanol production by free cells of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 673-676.
 29. Jang, G., C.R. Kim and Y.K. 1990. Studied on the immobilization of β -galactosidase from *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**: 426-433.
 30. Baratti, J., V.K. Jain and I. Toran-Diaz. 1985. Preparation and characterization of immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Biotech. Bioeng.* **27**: 273-279.

(Received June 18, 1992)