

## *Rhizopus japonicus*와 *Zymomonas mobilis*의 혼합고정화 배양계에 의한 생전분으로부터 에탄올 생산

최수철 · 이상원 · 박석규\* · 성찬기\*\* · 손봉수 · 성낙계

경상대학교 식품공학과

\*순천대학교 식품영양학과

\*\*중앙대학교 화학과

### Ethanol Production from Raw Starch by Co-Immobilized Mixed *Rhizopus japonicus* and *Zymomonas mobilis*

Soo-Cheol Choi, Sang-Won Lee, Seok-Kyu Park\*, Chan-Ki Sung\*\*, Bong-Soo Shon and Nack-Kie Sung

Dept. of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

\*\*Dept. of Chemistry, Chung-Ang University, Seoul 156-757, Korea

#### Abstract

Ethanol production from raw starch was performed using the co-immobilized culture system of *Rhizopus japonicus* and *Zymomonas mobilis*(R-Z). Glucose production in immobilized *R. japonicus* culture was 2-fold higher than that in free cell culture. Ethanol production was 1.67g/L( $Y_{p/s}$ , 0.094) and 6.54g/L( $Y_{p/s}$ , 0.38) in R-Z and R-Z 24 culture system, respectively. R-Z system was modified and designated as R-Z 24 system by replacing cotton plug with silicon check valve after 24h fermentation with R-Z system. Optimal substrate concentration for ethanol production in batch culture was 5%(w/v) and ethanol concentration produced was 15.02g/L( $Y_{p/s}$ , 0.36). Ethanol yield( $Y_{p/s}$ , 0.38) in fed-batch culture of 5 times with 2%(w/v) substrate was equal to that in batch culture of 2%(w/v) substrate.

**Key words:** *Rhizopus japonicus*, *Zymomonas mobilis*, co-immobilization, ethanol production

#### 서 론

천연에 존재하는 biomass로부터 유용물질의 생산은 전처리, 당화 및 발효과정의 3단계로 거쳐야 하기 때문에 조작이 복잡하고 많은 경비와 에너지가 필요로 한다. 따라서 당화와 발효를 동시에 할 수 있는 system의 개발은 매우 중요하다고 생각한다.

그 중에서 서로 다른 기능의 미생물 세포를 고분자 담체내에 동시 고정화하여 유용물질을 간단한 공정으로 생산할 수 있는 포괄고정화 system을 들 수 있다. 이 방법은 간단하고 고정화시킨 상태에서 세포의 증식이 가능하며, 또한 장시간 반복적으로 이용이 가능하다는 장점이 있다(1,2).

그러나 산소를 gel bead의 전체(표면부와 중심부)

에 균일하게 공급하기 어렵기 때문에 단독 고정화된 미생물이 호기성인 경우는 gel bead의 표면부에만, 또 혐기성균인 경우는 내부에서만 생육하여 gel bead 전체의 효율적인 이용이 어렵다(3-7).

그렇기 때문에 본 연구자들은 산소가 부족한 gel bead 중심부의 산소공급을 높이는 것이 아니고, gel bead의 혐기적 부분을 혐기성균의 생육장소로서 적극적으로 이용하기 위하여 동일 gel bead내에 혐기성균과 호기성균을 동시에 고정화하는 혼합고정화 기술을 확립하여(Fig. 1), 전보(8)에서 호기성의 *Aspergillus awamori*와 혐기성의 *Zymomonas mobilis*로 구성된 혼합고정화 배양계(A-Z계)를 개발하여 그 기초적인 결과를 이미 보고한 바 있다. 그러나 이 system은 기질이 비교적 분해하기 쉬운 가용성 전분인 경우에는 gel

\*To whom all correspondence should be addressed

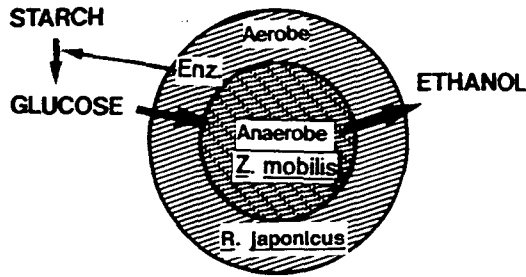


Fig. 1. Concept of co-immobilized culture system of *Rhizopus japonicus* and *Zymomonas mobilis* (R-Z culture system).

bead로부터 균사누출도 없이 고수율의 에탄올을 얻을 수가 있었지만, 난분해성인 생전분을 사용했을 때는 배양시간이 길고, gel bead로부터 균사가 누출되는 현상이 관찰되어, 에탄올 수율이 떨어지는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 이와같은 문제점이 난분해성 기질을 사용했을 때, 모든 배양계에서 일어나는 현상인지 아니면 A-Z계에만 일어나는 현상인지를 검토하기 위해서, 일반적으로 양조공업에서 많이 사용되고 있는 *Rhizopus japonicus*(R계)와 *Z. mobilis*(Z계)로 구성된 R-Z계를 만들어 A-Z계와 비교·검토하였다. 또한 R-Z계의 산소공급을 조절하여 배양하므로써 A-Z계 보다 에탄올 수율을 향상시켰고, 장기간 사용 후의 gel bead내의 균주 분포상태 및 안정성을 조사하였으며, 장기배양에 의한 R-Z계의 유용성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 공시균주 및 배지

호기성 곰팡이로서는 *R. japonicus*(일본 합동주정으로부터 분양)를 사용하였으며, 혐기성의 세균으로서 에탄올 생산균인 *Z. mobilis* IFO 13756을 사용하였다. 공시균주의 모든 배지성분은 전보(8)와 동일하다. 탄소원으로서 2%의 옥수수 생전분을 사용하였으며, 가열살균에 의한 열분해를 피하기 위하여  $\gamma$ -선 조사(36~42 KGy, 6시간)에 의하여 멸균하였다.

#### 혼합고정화법 및 배양조건

혼합고정화법은 *R. japonicus*의 포자 및 *Z. mobilis* 현탁액의 농도를 각각  $1.25 \times 10^9$  spore/L-gel, 1.0g cell/L-gel로 하여 3% Na-alginate용액에 정량적으로 첨가하고, 0.1M CaCl<sub>2</sub>용액 150ml 중에 떨어뜨린 후, 1시간 동안 온화하게 교반하여 gel화를 행하여 직경 3mm 정

도의 gel bead를 만들었다(8).

회분배양(batch culture)법은 혼합고정화된 gel bead 35g을 200ml의 본 배양 배지를 함유한 500ml 삼각플라스크로 옮겨 30°C로 120시간 동안 진탕배양(220rpm)을 행하였다.

유가배양(fed-batch culture)법은 1L jar fermentor (Iwashiy, Bioscience, Co. Ltd.)에 본 배양배지 500ml와 gel bead 110ml를 접종하여 30°C에서 220rpm으로 행하였다. 이 때의 pH는 1N-NaOH를 사용하여 4.3 이하로 되지 않도록 조절하였고, 시료의 공급은 배양 4일 이후부터 48시간 마다 하였으며, 시료 채취는 배양 24시간 마다 행하였다. 산소의 공급은 24시간 행하고, 그 이후부터는 질소가스를 공급하여 용존 산소 농도를 0ppm으로 유지하였다.

#### 산소 공급량의 조절

혼합고정화 배양계내의 호기적 배양을 위해서 배양 초기에는 면전을 이용하였으며, 혐기적 배양을 위한 산소공급 차단은 배양개시 후 일정시간이 경과하였을 때 면전을 본 연구에서 특수제작한 check valve가 부착된 실리콘 plug로 교환하므로써 이루어지게 하였다(8).

#### 에탄올 및 당의 분석

배양액 중의 에탄올 농도는 원심분리(3,500rpm, 15분)하여 얻은 상정액 2 $\mu$ l를 사용하여 GLC(Yanaco G180)로 측정하였다(8). 분석조건은 chromosorb 105(60~80 mesh) column(3.4mm i.d.  $\times$  2m); injector temperature, 210°C; column temperature, 210°C; flame ionization detector로 하였으며, 내부표준물질로서는 n-propanol(和光純藥)을 시료 3ml당 120 $\mu$ l를 첨가하여 사용하였다. Glucose농도는 mutalotase · GOD법[Glucose-C II-Test Wako, 和光純藥]을 이용하여 정량하였고(8), 총 당량은 phenol-sulfuric acid법으로 정량하였으며(9), 비 glucose당량은 총 당량에서 glucose량을 뺀 것으로 하였다. Gel bead단편의 관찰은 면도칼로 gel bead를 절단하여 위상차 현미경(Carl Zeiss Jena, Germany)으로 배율 200배에서 행하였다(10).

### 결과 및 고찰

#### 액체배양과 고정화배양의 비교

*R. japonicus*가 생전분의 분해에 미치는 영향을 밝히기 위해서 *R. japonicus*를 액체 및 고정화 배양을 비교한 결과(Fig. 2), 액체 및 고정화배양은 모두 120시

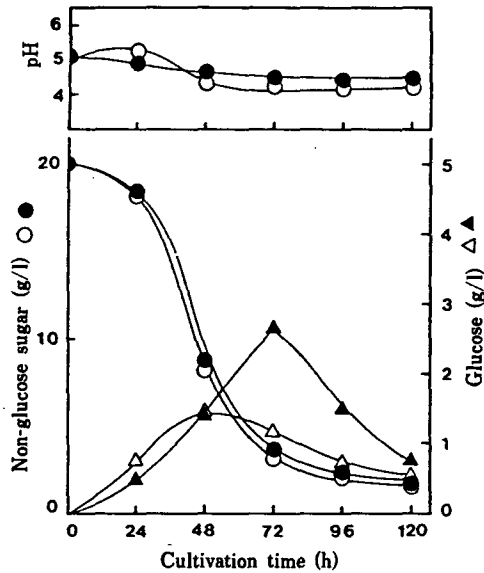


Fig. 2. Comparison of starch hydrolysis from raw starch by free cell (O, Δ) and immobilized *R. japonicus* (●, ▲) culture system.

간까지 배양하여도 생전분은 완전히 분해되지 않았고 1.5~2.8g/L 정도가 미분해 상태로 남아 있었으며, pH는 액체배양과 고정화배양에서 유사한 형태로 변화하면서, 배양 48시간 후에는 4.0 부근으로 떨어졌다.

액체배양에 있어서 *R. japonicus*는 과잉의 산소공급으로 균사가 서로 엉키어 배양 후기에 약 5cm 정도의 큰 pellet 덩어리를 형성하였고, 배양 48시간에 최대로 glucose가 생성되었으나(1.3g/L), 그 이후는 서서히 감소하였다.

고정화 배양에 있어서 gel bead의 *R. japonicus* 균사 누출상태는 배양 48시간 이후 약간씩 나타났고, 96시간째에는 누출균사가 삼각플라스크의 벽에 붙어 둥근 띠 모양을 형성하기도 하였다. 이와 같은 결과는 *A. awamori*와 *Saccharomyces cerevisiae*를 혼합고정화하여 가용성 전분으로부터 에탄올 생산을 행할 경우에 배양액의 pH가 4.5 정도를 유지하면서, 배양 60시간으로 완료되어 gel bead로부터 균사의 누출현상이 큰 문제로 되지 않았다는 보고와 비교하면(11), 생전분은 난분해성 기질이기 때문에 배양시간이 길어지고, 균사가 과잉 생육하여 pH가 낮아져, gel bead로부터 균사가 누출된 것으로 생각된다.

전분으로부터 생성된 glucose의 축적량을 비교하면 *R. japonicus*의 배양 72시간에는 고정화배양이 액체배양 보다 약 2배 이상 많이 나타났다(Fig. 2). 이는 곰팡이를 고정화하므로써 곰팡이 균사의 생육장소를 gel

bead 표면부로 제한시키기 때문에 곰팡이 균사의 과잉 생육에 따른 glucose의 과잉소비를 억제시킨 결과로 추측된다. 그러나 고정화배양의 경우 72시간 이후부터 glucose량이 급속히 감소하는 이유는 누출균사의 왕성한 증식 때문으로 판단된다. 일반적으로 효소를 고정화할 경우에는 효소 활성이 약간 떨어진다는 문제점이 지적되고 있으나, 본 연구에서와 같이 생균을 포괄 고정화하여 유용물질을 생산할 경우에는 액체배양 보다 더 큰 효과를 얻을 수 있다는 것이 확인되었다.

### R-Z계의 에탄올 생산성

생전분으로부터 에탄올 생산을 효율적으로 행하기 위해서 *A. awamori*와 *Z. mobilis*(A-Z계), *R. japonicus*와 *Z. mobilis*(R-Z계) 혼합고정화계를 각각 만들어, 난분해성의 생전분을 기질로 배양했을 경우 배양액 중의 pH, 비glucose당량 및 에탄올 함량을 경시적으로 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.

R-Z계에 있어서 생전분의 분해속도는 A-Z계 보다 24시간 정도 빨랐지만, A-Z계를 가용성전분(11)에 이용했을 때의 분해속도 보다 상당히 늦은 것으로 나타났다. 또한 R-Z계에서는 pH 저하가 A-Z계 보다 심하고, 에탄올 생산량은 A-Z계의 약 1/2이었다. 또 균체량은 A-Z계와 R-Z계가 각각 2.54g/L와 3.63g/L로서 R-Z계가 많았으며, gel bead로부터 균사의 누출도 R-Z계가 현저하게 많았다. 이 결과로부터 혼합고정화 배양계에 사용된 R-Z계는 A-Z계에 비하여 기질의 분해속

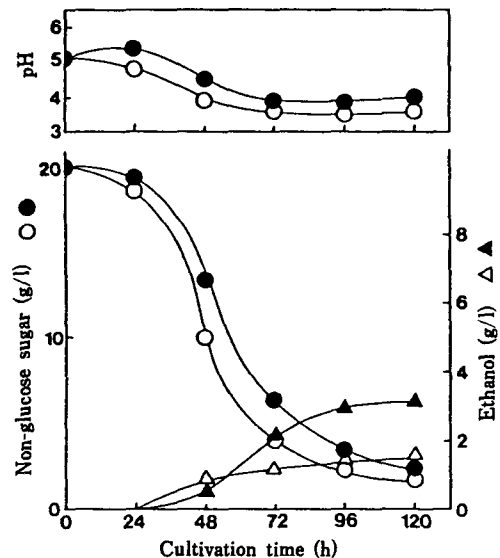


Fig. 3. Comparison of ethanol production from raw starch by co-immobilized R-Z culture system (O, Δ) and A-Z culture system (●, ▲).

도가 빠르고, 호기적 배양에서 균사증식이 많아 에탄올 생산량이 적었기 때문에 산소공급을 제한하면 A-Z계 보다 에탄올 수율이 상당히 증대될 것으로 기대된다.

산소 공급량이 R-Z계에 미치는 영향

배양 중에 호기적 조건을 혐기적 조건으로 전환함으로써 호기적 조건인 배양 전기에는 곰팡이에 의한 amylase 생산을 행하여 전분의 당화를 촉진시키고, 혐기적 조건인 배양 후기에는 고정화된 곰팡이의 gel bead로부터 균사의 누출과 pH 저하가 억제됨과 동시에 배양 전기에서 생산된 glucose로부터의 알콜발효가 촉진될 것이다.

이런 점을 고려하여 본 연구자들은 산소의 공급조절을 위하여 초기에는 면전을 사용한 호기배양을 시작한 후, 12, 18, 24, 36시간째에 특수가공한 check valve가 부착된 실리콘 plug로 교환하여 혐기적 배양을 실시한 결과(Fig. 4), 산소공급시간이 길수록 기질의 가수분해 속도가 약간 빠르게 나타났으며, 또한 pH의 변화는 12, 18, 24시간째부터 혐기배양을 행한 것은 거의 4.5를 유지하는 반면에 36시간째 부터 혐기배양을 한 것은 배양중기부터 4.0 이하로 떨어졌다.

또한 에탄올 생산량은 check valve를 부착한 실리콘 plug를 전환한 시점부터 급격하게 에탄올이 생산되었다. 36시간째에 배양조건을 바꾼 것의 기질 분해속

도는 다른 조건에 비하여 약간 빠르게 나타났지만 에탄올 생산량이 낮았는데(4.75g/L), 그 이유는 장시간 호기적 배양을 하므로서 산소 공급량이 많았기 때문으로 생각된다. 12시간째에 전환한 것은 기질 분해속도가 가장 늦었으며, 에탄올 생산 농도는 5.3g/L이었다. 18시간과 24시간에 전환한 것은 기질분해와 pH 변화에 있어서 아주 비슷하였다. 에탄올 생산량은 배양 96시간째에 각각 5.89g/L와 6.54g/L을 생산하여 0.35(g/g)와 0.38(g/g)의 수율을 나타내었다. 따라서 R-Z계의 최적 배양조건으로서 배양 24시간까지는 호기배양하고, 그 이후는 혐기배양을 행하므로서(이하 R-Z 24계), 호기적 배양시의 문제점으로 대두되고 있는 pH의 저하나 gel bead로부터의 균사누출을 억제하고 에탄올의 생산성도 향상시킬 수가 있었다.

이상의 결과는 Dostalek와 Haggstron(12)이 *Saccharomyces fibulinger*와 *Z. mobilis*를 혼합배양하여 수용성 전분으로부터 에탄올을 생산하는 연구에서 배양계의 진탕속도를 배양 중에 바꾸어 산소 공급량을 조절하므로서 30g/L의 전분에서 9.7g/L의 에탄올 생산량을 증가시켰다는 보고와 유사하였다.

배양시간에 따른 gel bead의 균주분포 상태 및 형태

R-Z계의 최적 조건을 사용하여 생전분에서 에탄올 생산을 행할 때 gel bead내의 균주분포상태를 위상차

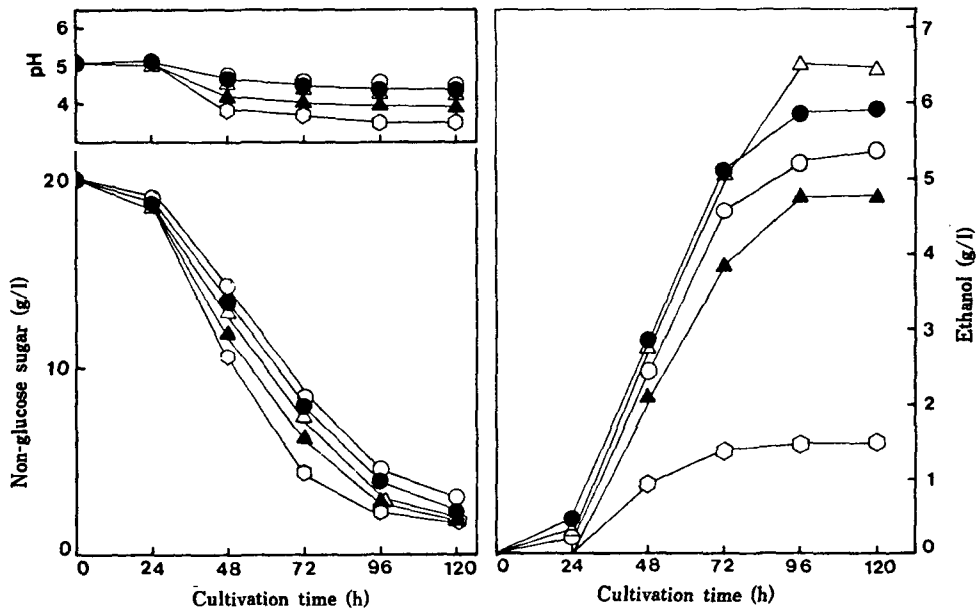


Fig. 4. Effects of transition time from aerobic to anaerobic condition on raw starch hydrolysis(a) and ethanol production(b) co-immobilized R-Z system.  
 ○ : Control, ○ : 12h, ● : 18h, △ : 24h, ▲ : 36h

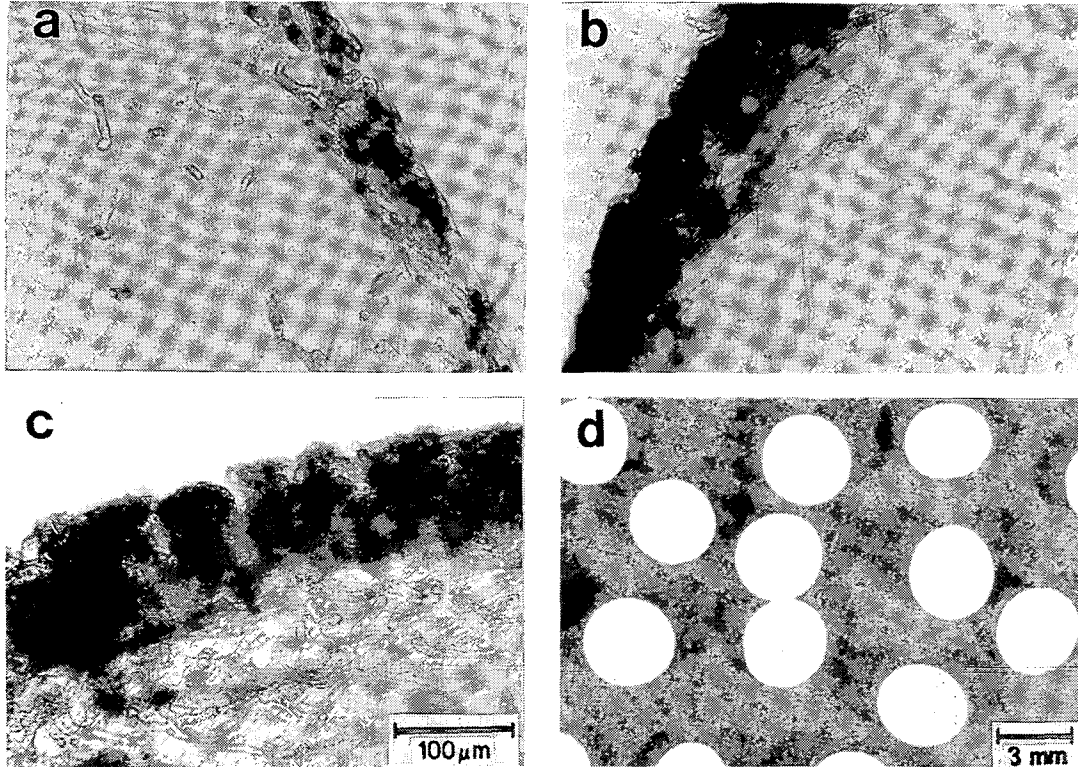


Fig. 5. Microphotographs of cross sections(a, b, c) and whole(d) of co-immobilized R-Z 24 culture system by replacing cotton after 24h fermentation with R-Z system.  
a: 18hr, b: 24hr, c: 120hr, d: 120hr

현미경으로 관찰한 것(Fig. 5-a,b,c)과 표면형태를 관찰한 사진(Fig. 5-d)을 Fig. 5에 나타내었다. 배양이 진행됨에 따라 gel bead내에서 곰팡이와 세균은 산소 요구성의 차이에 따라 두 부분으로 구분되어 잘 성장하고 있음을 알 수 있었다. 즉 호기성의 *R. japonicus*는 산소가 풍부한 gel bead의 표면에서 증식하고, 혐기성의 *Z. mobilis*는 gel bead의 중심부에서 생육하였다. 18시간 배양한 gel bead(Fig. 5-a)에서도 *Z. mobilis*의 생육을 관찰할 수 있었으며, 배양을 진행함에 따라 gel bead 표면부의 곰팡이 균사층이 두터워짐을 관찰할 수 있었다. 120시간 배양한 gel bead(Fig. 5-c)를 무작위로 취하여 그 형태를 관찰하여도(Fig. 5-d) 매우 안정된 형태를 유지하고 있음을 알 수 있었다.

Kurosawa 등(1)은 생세포를 함유하는 gel bead내에서의 산소공급 부족은 물질이동저항이 직접적인 원인이 아니고, 액중에서 산소이동 속도에 비례하여 이동 속도가 늦어지거나 혹은 액중에서 산소용해도가 낮은 것이 원인이라고 보고하였다. 또 그는 *A. awamori*의 고

정화 균체를 보통 보다 높은 용존산소 농도(0.218mmol/L = 7ppm)에서 배양하여도, 산소는 gel bead표층에서 300μm 부근까지만이 도달하지 않았다고 보고하였다.

Osuga 등(4)은 순수한 산소를 공급한 경우에 K-carrageenan gel bead에 고정화한 *Acetobacter aceti*의 세포는 gel bead내에서 증식이 150~200μm로 제한되기 때문에 산소가 초산생성의 제한인자임을 보고하였다. 이러한 보고를 고려해 볼 때, 본 연구에서 개발한 혼합 고정화 배양계는 산소요구성이 다른 호기성의 곰팡이와 혐기성의 *Z. mobilis*를 동시 혼합고정화함에 의해서 산소공급이 곤란한 gel bead의 중심부까지 유효하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

#### 장기간 배양에 의한 에탄올 생산

##### 기질 농도의 영향

R-Z 24계가 갖는 에탄올 생산능을 명확히 관찰하기 위해서 기질 농도 2, 5, 10%(w/v)에서 배양한 것을 서로 비교한 결과(Fig. 6), 생산된 에탄올 농도 및 수율은 2% 배지의 5일째에 6.54g/L( $Y_{p/s}$ , 0.38), 5% 배지의 6일

째에 15.02g/L( $Y_{p/s}$ , 0.37), 10% 배지의 13일째에 29g/L ( $Y_{p/s}$ , 0.33)로 측정되어 생전분의 농도가 높아질수록 에탄올 생산량은 증가하지만, 에탄올 수율은 감소하는 경향을 보였다. 한편 배지 중의 glucose는 생전분 농도 2%와 5%에서는 거의 생성되지 않았지만, 10%의 경우에는 발효 말기에 약 5.3g/L가 측정되었다(결과 미제시). 또한 pH의 변화에 있어서도 기질 농도가 높을수록 낮아져 10%의 경우, 배양 72시간 이후부터 4.0 이하로 낮아졌으며 배양 후기에 균사의 누출현상도 약간 관찰되었다.

생전분의 농도가 증가함에 따라 에탄올 수율이 감소하는 것은 배양시간이 상대적으로 길어짐에 따라 생성된 glucose의 대부분이 곰팡이 균체증식에 사용된 결과로 곰팡이 균사의 과잉생육과 유기산의 생성에 따라 pH가 낮아져 *Z. mobilis*의 활성이 떨어졌기 때문으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 회분배양을 할 경우에는 기질 농도 5%의 에탄올 수율이 2%와 거의 동등하기 때문에 R-Z 24계를 사용한 회분배양에서는 기질 농도를 5%로 하는 것이 적당하다고 판단되었다.

Kurosawa 등(11)은 A-Z계를 사용하여 가용성 전

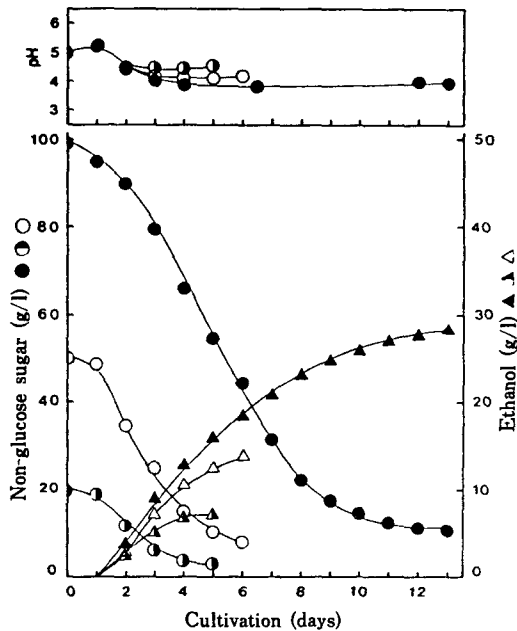


Fig. 6. Effect of initial raw starch concentration on the rate of hydrolysis and ethanol production by R-Z 24 culture system by replacing cotton plug with silicon check valve after 24h fermentation with R-Z system.  
2%(○, △), 5%(○, △), 10%(●, ▲)

분으로부터 에탄올 생산을 행한 연구에서도 기질 농도를 2, 5, 10%로 증가시킴에 따라 pH의 저하가 급격하고, 수율이 감소한다고 보고한 것으로 보아 이러한 현상은 기질의 종류와 혼합고정화하는 균종에 관계없이 일어나는 현상으로 판단된다.

유기배양의 영향

R-Z 24계의 유용성을 명확히 하기 위해서 플라스크와는 산소공급 system이 다른 발효조를 사용하여 에탄올 생산을 행하였다. 전분은 분해하기 쉬운 부분과 분해하기 어려운 부분이 혼재되어 있기 때문에(3), 연속배양에서 생전분을 완전히 분해시키기 위해서는 배양시간이 길게 될 것으로 생각된다. 또한 연속배양과 비교하여 fed batch배양은 실질적으로 생전분의 분해하기 어려운 부분이 효소와 장시간 접촉·반응할 수 있기 때문에 더욱 효과적으로 생각된다.

2% 기질을 기본으로 하여 유기배양을 행한 결과 (Fig. 7), 장시간에 걸친 혐기상태에도 불구하고, 배양액중의 glucoamylase 활성은 3일 이후부터 일정한 값 (35~40units/ml)을 유지하였다(결과 미제시). 5회분의 기질을 첨가하는 동안 기질의 가수분해 속도 및 에탄올 수율의 감소는 관찰되지 않았으며, 최종적으로 36g/L( $Y_{p/s}$ , 0.37)의 에탄올이 얻어져 생산성은 2.8g/L/day였다. 또한 장기배양에 의한 gel bead, R-Z 24계의 혼합고정화 배양계는 삼각플라스크 배양 뿐만이 아니

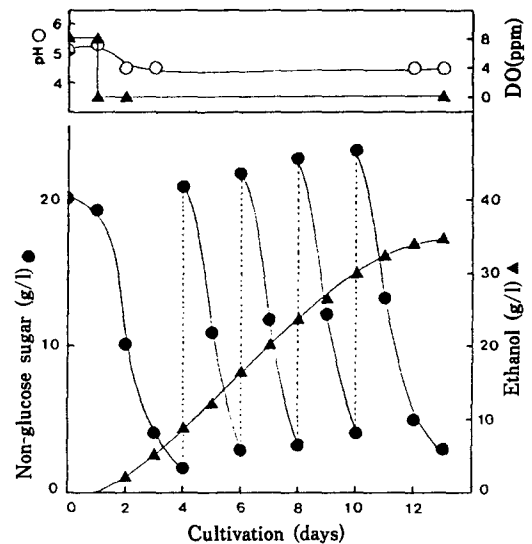


Fig. 7. Time course of ethanol production from raw starch in fed-batch fermentation with R-Z 24 culture system by replacing cotton plug with silicon check valve after 24h fermentation with R-Z system.

고, 발효조 배양에서도 유용하게 사용될 수 있는 것으로 나타났으며, 기질 농도 10%의 회분배양 보다는 유가배양을 행하는 것이 효과적인 것으로 나타났다. 본 혼합고정화 배양계는 난분해성 기질로부터의 직접 유용 물질을 생산하는데 효과적인 배양계로 밝혀졌기 때문에 이후의 연구는 효소의 상승효과를 이용하여 기질 분해속도를 더욱더 단축시키기 위해서 기원이 다른 효소를 생산하는 다종류의 균종으로 구성된 혼합고정화 배양계 개발을 실시하고자 한다.

## 요 약

호기성의 *Rhizopus japonicus*와 혐기성 *Zymomonas mobilis*로 구성된 혼합고정화 배양계(R-Z계)를 제조하고, 생전분으로부터 에탄올 생산에 응용하였다. *R. japonicus*를 고정화배양하프로서 액체배양에서 보다 2배 높은 glucose량을 얻었다. R-Z계의 에탄올 생산량은 1.67g/L( $Y_{p/s}$ , 0.094)이었지만, 배양 24시간째 부터 산소공급을 억제한 R-Z 24계에서는 6.54g/L( $Y_{p/s}$ , 0.38)의 에탄올을 얻어 대조구의 약 4배를 향상시켰다. 회분 배양에서는 5%의 기질 농도가 적당하였으며, 생산된 에탄올은 15.02g/L( $Y_{p/s}$ , 0.36)이었다. 2% 기질을 5회 첨가한 유가배양에서는 2%기질의 회분배양과 동등한 수율인 0.38을 얻었다.

## 감사의 글

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

## 문 헌

1. Kurosawa, H., Matsumura, M. and Tanaka, H. : Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cell. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 926(1989)
2. Shinmyo, A., Kimura, H. and Okada, H. : Physiology of  $\alpha$ -amylase production by immobilized *Bacillus amyloliquefaciens*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 7(1982)
3. Hizukuri, S. : Raw starch digesting activity and kinetic properties of glucoamylase. *J. Jap. Soc. Starch Soc.*, **34**, 98(1987)
4. Suga, J., Mori, A. and Kato, J. : Acetic acid production by immobilized *Acetobacter aceti* cell entrapped in a  $\kappa$ -carrageenan gel. *J. Ferment. Technol.*, **62**, 139(1986)
5. Kurosawa, H., Ishikawa, H. and Tanaka, H. : L-Lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 183(1988)
6. Wada, M., Uchida, T., Kato, J. and Chibata, I. : Continuous production of L-isoleucine using immobilized growing *Serratia marcescens* cell. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1175(1980)
7. Gosmann, B. and Rehm, H. J. : Oxygen uptake of microorganisms entrapped in Ca-alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 163(1986)
8. 이상원, 박석규, 손봉수, 최수철, 서권일, 성낙계, 김홍출 : *Aspergillus awamori*와 *Zymomonas mobilis*로 구성된 혼합고정화 배양계의 최적조건. *한국영양식량학회지*, **24**, 803(1995)
9. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350(1956)
10. Abdel-Halim, M., El-Sayed, M. and Rehm, H. J. : Morphology of *Penicillium chrysogenum* strains immobilized in Ca-alginate beads and in penicillin fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 89(1988)
11. Kurosawa, H., Nomura, N. and Tanaka, H. : Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 716(1989)
12. Dostalek, M. and Haggstron, M. H. : Mixed culture of *Saccharomycopsis fibuliger* and *Zymomonas mobilis* on starch-use of oxygen as a regulator. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 269(1983)

(1996년 5월 24일 접수)