

## 고정화 효모를 이용한 에탄올 추출발효에서 최적 pH 및 온도에 대한 연구

이진석\* · 안필용 · 홍석인

고려대학교 공과대학 화학공학과  
\*한국동력자원연구소 바이오매스연구실  
(1990년 6월 15일 접수, 1990년 9월 22일 채택)

## Study of the Optimum pH and Temperature in Extractive Fermentation using Ca-alginate Entrapped *S. cerevisiae*

Jin-Suk Lee\*, Pyl-Yong Ahn and Suk-In Hong

Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea  
\*Biomass Lab., Korea Institute of Energy and Resources, Daejeon 300-031, Korea  
(Received 15 June 1990; accepted 22 September 1990)

### 요 약

Ca-alginate에 고정화한 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 에탄올의 추출발효에서 최적 pH와 온도에 대해 검토하였다. 혼합용매(TBP : oleic acid = 3 : 2)를 사용하여 추출발효했을 때의 최적 pH와 온도는 pH 5.8과 25°C로서 자유효모를 이용한 발효의 최적 pH와 온도인 pH 4.5 및 30°C와 상당한 차이가 있었다 [1]. 이 차이는 pH 5.8, 25°C에서 고정화 효모의 pH와 온도에 대한 안정성때문에 효모의 활성도가 거의 저하되지 않은 반면 용매 추출능력의 증가로 에탄올에 의한 반응 억제효과가 줄었기 때문으로 해석된다. 온도가 25°C이고, pH 5.8의 조건에서 400 g/l 포도당 용액 추출발효시 얻은 에탄올 생산성은 1.9 g/l-hr 이었고, 최대 에탄올 농도는 180 g/l로서 온도가 30°C이고, pH 4.5의 발효조건에서 얻은 1.6 g/l-hr와 110 g/l에 비해 생산성은 20% 증가되었고, 최대 에탄올 농도는 60% 이상 높았다. 이런 최적 온도와 pH의 이동은 고정화 균체를 이용하여 수행되는 모든 생성물 억제형(product inhibition type)의 추출발효에서도 고려되어야 한다고 생각된다.

**Abstract**—Optimum pH and temperature were determined in an extractive fermentation system using Ca-alginate entrapped *Saccharomyces cerevisiae*. The highest ethanol concentration and productivity of the extractive fermentation system were observed at pH 5.8 and 25°C. Meanwhile, the optimum pH and temperature of a fermentation system using *S. cerevisiae* were determined to be pH 4.5 and 30°C. The reason for this shift is that a product inhibition effect is less due to the improved extraction capacity of the solvent at new optimum pH and temperature and the immobilized cells have relatively constant activity over the pH and temperature range. Extractive fermentation at new pH and temperature present higher productivity and maximum ethanol concentration, 1.9 g/l-hr and 180 g/l, respectively than their counterparts, 1.6 g/l-hr and 110 g/l, at pH 4.5 and 30°C. Shift of new optimum pH and temperature is possible for any extractive fermentation by using immobilized cells in which product inhibition is significant.

## 1. 서 론

생성물억제(product inhibition) 발효계에서는 생성물에 의한 반응 억제효과를 줄이고 높은 생산성을 유지하기 위해 생성물을 원상태(in situ)로 분리하는 과정이 필요하다. 생성물의 회수, 분리공정으로는 진공증류, 흡착, 막분리, 투과기화법(pervaporation) 및 용매추출법 등이 있다[1-5]. 이 중 용매추출 방법은 알콜분리의 경우 적합한 용매를 사용한다면 가장 경제성이 높은 공정으로 보고되었으며[5] 용매추출은 널리 사용되고 있는 단위조작 공정이므로 기존장치 및 기술의 활용이 가능하고 scale-up이 용이하다는 장점이 있다.

추출발효를 효율적으로 수행하기 위해 사용될 용매는 용매상에서 생성물의 높은 분포 계수(K)와 선택성( $\alpha$ ), 수용액상에 대한 용매의 낮은 용해도, 균체에 대한 무독성 및 가격이 저렴해야 한다. 현재까지 위 조건에 부합되는 용매를 찾기 위한 연구는 많이 진행됐으나[6-10], 선택된 용매의 추출조건 최적화에 대한 연구는 거의 없다.

용매의 추출능력은 그 용매의 고유 특성값이지만 추출액내의 생성물 농도, pH 및 온도 등의 추출조건에 따라 달라지는 변수이다. 항생제 분리공정에서는 pH와 온도에 따른 용매 추출능력의 변화를 이용하여 발효후 생성된 항생제를 분리하는데 사용한다[11]. 그러나 위에 언급된 단순 추출 분리공정에서와는 달리 추출발효계에서는 pH와 온도가 용매의 추출능력 뿐만 아니라 균체의 활성도에도 절대적인 영향을 미치므로 추출발효의 생산성을 높일 목적으로 pH와 온도를 임의로 조절한다는 것은 어렵다. 그 이유는 추출능력을 높이는 쪽으로 pH와 온도를 조절하면 균체의 활성도가 저하될 수 있으며 그 결과 발효계의 생산성이 오히려 떨어질 수 있기 때문이다.

한편 고정화 균체는 자유세포(free cell)에 비해 균체 농도가 높고 연속 배양의 경우 높은 회식율에서도 안정성을 유지할 수 있어 높은 생산성을 얻을 수 있다. 특히 가동방법에 의한 균체 고정화계에서는 담체가 자양분, 생성물 등의 이동에 대해 확산벽(diffusion barrier)으로 작용하는 문제점이 있지만 외부 환경으로부터 균체를 보호하는 역할도 하여 자유세포에 비해 고정화 균체는 배양온도와 pH에 대해 보다 높은 안정성을 나타내며, 그 결과 비교적 넓은 범위의 최적 pH와 온도를 갖는다[12-15].

고정화 균체를 이용한 추출발효에서는 앞에 언급한

대로 고정화 균체의 pH와 온도에 대한 안정성이 높으므로 사용 용매의 추출능력을 극대화할 수 있는 pH와 온도로 조절하여야 하지만 현재까지 고정화 균체를 이용한 추출발효에서는 이런 점이 간과되고 있으며, 자유 또는 고정화 균체의 발효에서 결정된 최적 pH와 온도를 사용하고 있다.

본 연구에서는 대표적인 생성물 저해공정인 에탄올 발효를 모델계로 하여 고정화 효모를 이용한 추출발효에서 배양배지의 pH와 온도가 발효 생산성에 미치는 영향을 검토하였고, 얻어진 연구결과를 토대로 새로운 최적 pH와 온도 개념에 대해 논의하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2-1. 사용 균주

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858을 yeast-malt agar 배지에 배양하여 사용하였으며 배지는 4℃에서 보관하였다.

### 2-2. 시약

올레인 산과 tributyl phosphate(TBP)는 Junsei사의 특급 또는 일급 시약을 사용하였으며 실험에 사용된 기타 모든 시약들도 Junsei, Wako사의 시약급 제품이 었다

### 2-3. 배지 조성 및 배양 조건

종균 배양용 배지의 조성(g/l)은 포도당 20, yeast extract 3, malt extract 3, 펩톤 5였으며, 발효배지의 조성(g/l)은 포도당 200-400, yeast extract 8.5,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12,  $\text{CaCl}_2$  0.06이었다. 0.05 M lactic acid와 0.1 M NaOH를 사용하여 배양배지의 초기 pH를 최적 배양조건인 pH 4.5로 조절하였다[16]. 또한 고농도 포도당 발효 배지의 멸균은 caramelization을 방지하기 위해 포도당을 따로 멸균하였다. 효모배양은 고체배지에서 균체를 취하여 30 ml 시험관에 들어있는 5 ml의 종균 배양용 배지에서 10시간 배양후 접종액으로 사용했다. 추출발효는 500 ml 삼각플라스크에 100 ml 발효배지와 추출용매 100 ml를 넣고 접종하여 회전식 배양기로 150 rpm, 30℃에서 배양하며 시간별로 알콜 생성량을 측정하였다. 온도의 영향을 연구할 때는 배양조건을 똑같이 유지하기 위해 각각 다른 온도로 유지되는 두 대의 회전식 배양기에 동일한 조성의 발효배지를 사용하여 150 rpm에서 동시에 배양하였다.

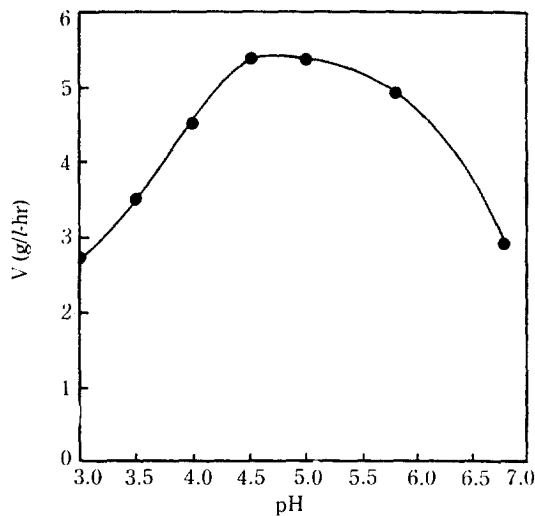


Fig. 1. Effect of pH on initial reaction rate.

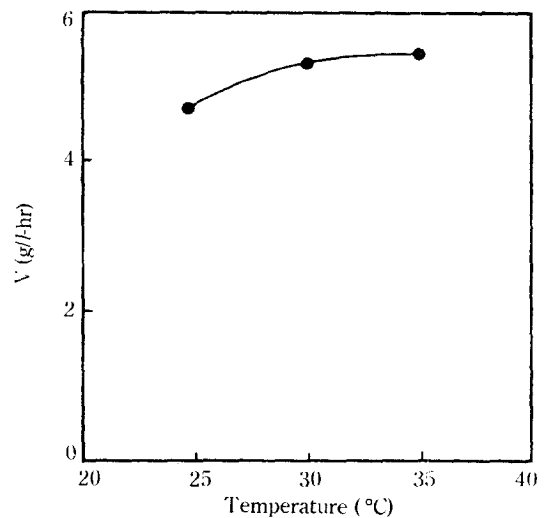


Fig. 2. Effect of temperature on initial reaction rate.

#### 2-4. 균체 고정화

고정화 효모 균체는 5 ml의 *S. cerevisiae* ATCC 24858 용액( $1 \times 10^8$  cells/ml)과 2% sodium alginate 용액 100 ml를 혼합하여 peristaltic pump(Gilson Co.)를 사용하여 주사바늘(21G)을 통해 0.05M  $\text{CaCl}_2$  용액에 떨어 뜨려 고정화 시켰다. 5 ml 가량의 고정화된 직경 3-4 mm 크기의 bead들은 약 2시간 가량 방치한 후 멸균 증류수로 충분히 씻은 다음 발효배지가 든 500 ml 삼각플라스크에 옮겨 24시간 동안 활성화시킨 후 추출발효 실험에 초기 접종 균체로 사용하였다.

#### 2-5. 에탄올 평형분배계수 측정

에탄올 농도가 10%인 배양용 배지와 추출용매(TBP : oleic acid = 3 : 2)를 1 : 1의 비율로 각각 9 ml씩 취하여 20 ml 시험관에 넣은 후 회전식 배양기에서 24시간 동안 혼탕하여 평형에 도달하도록 했다. 에탄올의 휘발을 방지하기 위해 시험관 입구를 밀봉하였고, 수용액상에 남아있는 잔류 에탄올은 시간, pH, 온도 및 용매 부피 등에 따라 여러 가지 시험조건하에서 기체 크로마토그래피를 사용하여 분석하였다.

#### 2-6. 분석 방법

균체량은 필요에 따라 10배에서 100배까지 희석하여 Spectronic 20(Bausch & Lomb Co.)로 500 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 준비된 표준곡선으로부터 산출했다. 고정화 균체농도는 약 0.1 ml의 Ca-alginate bead를 0.05 M sodium metahexaphosphate에 녹인 후

흡광도를 측정하여 결정하였다. 추출용매와 발효액 내의 에탄올 농도는 기체 크로마토그래피(Hewlett-Packard 437)로 분석하였으며, 사용 관은 Carbowax 20 M이었다. 내부 표준 용액은 n-부탄올이었고 시료주입구, 관 오븐(column oven), 검출기의 온도는 각각 180, 80, 250°C이었다. 포도당 농도는 발효액을 필요에 따라 10배에서 100배까지 희석한 후 DNS 방법으로 결정하였다.

### 3. 실험결과 및 고찰

#### 3-1. 고정화 효모의 pH와 온도에 대한 안정성

Ca-alginate에 고정화된 효모의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위해 활성화된 효모를 배양온도 30°C에서 pH를 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.8, 6.8로 변화시키면서 포도당 농도 200g/l 발효배지에서 배양하였으며 1시간 간격으로 4시간 동안 에탄올 농도를 측정하여 초기 에탄올 생산속도를 결정했다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 pH 4.5-5.8 범위에서 에탄올 생산속도는 거의 일정하였으며, 그 값은 5.3g/l였다.

포도당 농도 200g/l, pH 4.5의 발효배지에서 온도의 고정화 효모 생산성에 대한 영향을 조사하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 효모의 생산성은 온도의 증가에 비례하였으며 35°C일 때 생산성은 5.4g/l-hr로서 가장 높았으며 25°C에서의 생산성은 4.8g/l-hr이었다. 실험한 온도의 범위에서 효모의 활성도는 최대 활성도의 80% 이상을 유지했다. 이와 같이 고정화 효모는 자유 효모에

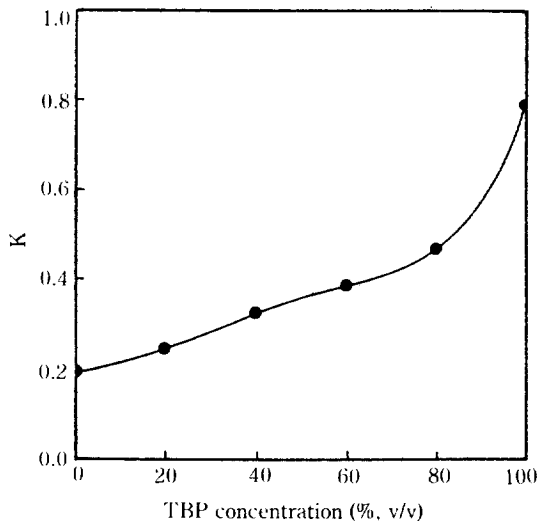


Fig. 3. Effect of relative TBP concentration on the ethanol distribution coefficient in extractant.

비해 pH와 온도에 대하여 우수한 안정성을 가졌다[17]. 이러한 결과는 다른 연구자들의 실험결과와도 일치한다 [12-15].

### 3-2. 추출용매 결정

추출발효에 사용된 용매는 에탄올의 K가 대단히 높은 TBP(K=0.8)와 에탄올에 대한 선택성이 좋은 올레인산( $\alpha=5$ )의 혼합용매였다. 혼합용매의 성분비가 에탄올의 추출능력과 활성도에 대해 미치는 영향을 결정하기 위해 TBP의 백분율을 20%씩 증가시키면서 이에 따른 추출능력과 균체 활성도를 검토하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 pH 4.5, 30°C에서의 10% 에탄올 수용액의 경우 혼합용매의 에탄올 추출능력은 TBP 함량이 증가함에 따라 계속 증가하였다. 순수 올레인산 용매인 경우 K는 0.19였고 TBP 함량이 100%일 때 K는 0.8로서 최대 추출능력을 나타냈다. 또한 자유 효모를 사용한 발효배지에서 용매의 에탄올 생산성에 대한 영향을 조사하여 그 결과를 Fig. 4에 도시하였다. 생산속도는 TBP 함량 증가에 따라 점차 감소하였으며 이는 효모에 대한 TBP의 독성 때문이라고 해석된다. 그러므로 본 연구에서는 효모의 활성도가 크게 저하되지 않으며(최대활성도의 80% 이상) 높은 추출능을 갖는 60% TBP 용매(K=0.41)를 고정화 효모를 이용한 추출발효의 사용 용매로 정했다.

### 3-3. 추출용매의 에탄올 추출능에 미치는 pH와 온

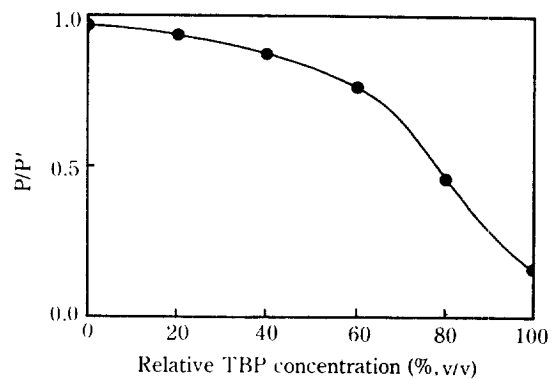


Fig. 4. Effect of relative TBP concentration in extractant on the specific ethanol production rate by free cells at pH 4.5 and 30°C.

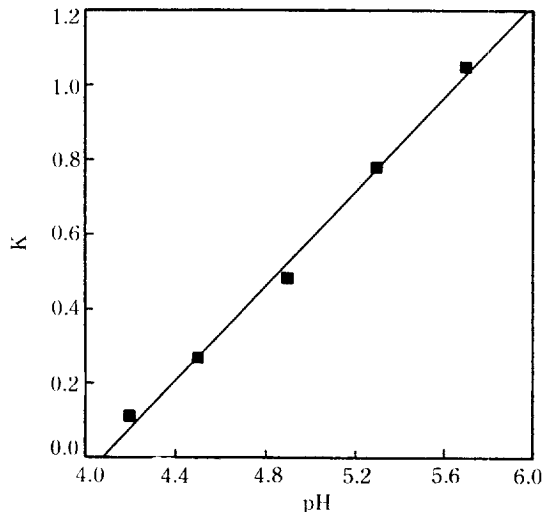


Fig. 5. Effect of pH on the ethanol distribution coefficient in extractant (Temp.=30°C).

### 도의 영향

pH가 추출용매(TBP 60%, oleic acid 40%)의 에탄올 추출능에 미치는 영향을 알아보기 위해 30°C의 추출용매를 고정화 효모의 최적 pH 범위인 pH 4.2부터 5.8까지 변화시키며 에탄올의 K를 결정하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 K는 pH가 증가할수록 커져서 pH 5.8에서 K는 1.05였다. pH에 따라 용매의 에탄올 추출능이 변화하는 메카니즘은 아직 밝혀지지 않았으나, Barros 등도 pH에 따른 용매의 에탄올 추출능력 변화를 보고하였다.

추출용매의 에탄올 추출능력에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위해 pH를 5.8로 일정하게 유지하고 25, 30,

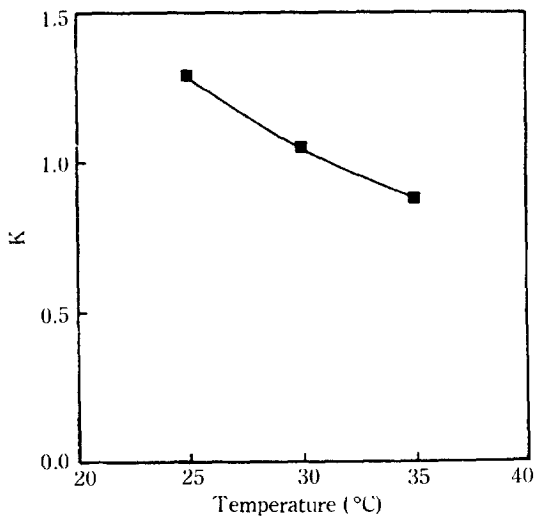


Fig. 6. Effect of temperature on the ethanol distribution coefficient in extractant.

35°C에서 K를 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 25°C에서 K는 1.29로 가장 높았으며, 온도 증가에 따라 K값은 점차 감소하여 35°C에서의 K는 0.92였다. 이와 같이 온도 감소에 따라 용매의 에탄올 추출능이 증가하는 것은 Hildebrandt의 solubility parameter 개념에 의해서 설명될 수 있다. 즉,

$$\delta = \{ \rho(H_v - R \cdot T) / M \}$$

에서 온도 T의 감소는  $\delta$ 의 증가를 가져오며 이는 에탄올 분배계수의 증가를 의미한다. 이와 같은 발효배지의 온도와 pH에 따른 용매 추출능력 변화는 추출 발효계의 생산성 및 최대 에탄올 농도에 대하여 중대한 영향을 미칠 것으로 기대된다. 이런 영향을 조사하기 위하여 포도당 농도 200, 400 g/l의 발효배지에서 Calginate 고정화 효모균체와 용매를 사용하여 추출발효하였다.

#### 3-4. 추출발효시 에탄올 생산성 및 최대 에탄올 농도에 미치는 pH 및 온도의 영향

pH 4.5와 5.8로 각각 조절된 포도당 농도 200g/l의 발효배지를 30°C로 유지하면서 추출발효하여 배양시간에 따른 에탄올 농도를 Fig. 7에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 pH 5.8로 조절된 발효배지에서 생산성과 최대 에탄올 농도는 3.2 g/l-hr와 95 g/l로서 pH 4.5로 조절된 발효배지에서의 2.3 g/l-hr와 78 g/l에 비해 생산성은 40%, 최대 에탄올 농도는 20% 이상 높았다. 이는 pH 5.8의 발효배지에서 효모의 활성도가 높았기

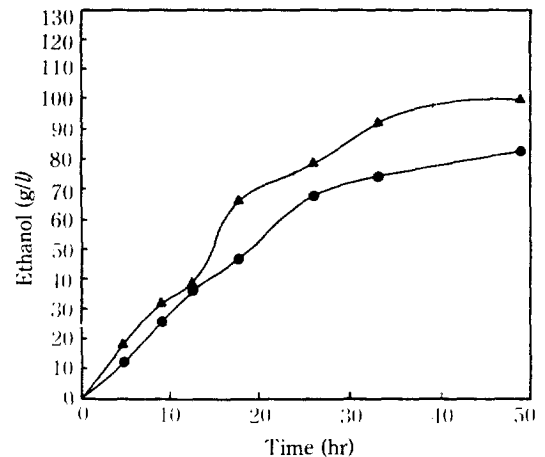


Fig. 7. Extractive fermentation of 200 g/l of glucose by immobilized yeast cells at 30°C and different pH values: (▲) 5.8, (●) 4.5.

때문이라고 해석하기 보다는 용매의 추출능력 향상으로 인한 pH 5.8의 배지에서 에탄올에 의한 반응 억제효과가 줄었기 때문으로 생각되고 이는 고정화 효모를 이용한 에탄올 추출발효에서는 용매의 추출능을 높이는 쪽으로 pH가 조절되어야 함을 보여준다.

고농도 기질의 추출발효에서 pH의 에탄올 생산성 및 최대 에탄올 농도에 대한 영향을 규명하기 위해 400 g/l 포도당 농도의 발효배지에서 추출발효를 수행하였다. Fig. 8 a, b에 나타난 바와 같이 pH 5.8로 조절된 추출발효에서의 잔류 포도당 농도는 75 g/l로서 가장 낮았으며, pH 4.5의 추출발효배지에서는 잔류 포도당 농도가 90 g/l이었다. 또한 pH 4.5와 30°C로 유지된 400 g/l 포도당 농도의 발효배지를 자유 효모를 배양하였을 때 잔류 포도당 농도는 180 g/l에 달했다. pH 5.8로 조절된 발효배지에서 최대 에탄올 농도와 생산성은 각각 135 g/l, 2.4 g/l-hr로서 pH 4.5로 조절된 발효배지에서 얻어진 최대 에탄올 농도와 생산성 값인 110 g/l와 1.6 g/l-hr에 비해 20-30% 높은 값을 가졌다. 용매추출에 의한 영향을 결정하기 위해 배양시간에 따른 수성상에서의 에탄올 농도를 측정하였다. Fig. 9에 나타난 바와 같이 수용액상에서 최대 에탄올 농도는 pH 4.5의 발효배지와 pH 5.8의 발효배지에서 각각 90 g/l와 60 g/l이었다. 이는 pH 4.5의 경우 보다 높은 수용액상의 에탄올 농도는 보다 큰 생체물 억제효과를 초래할 것이며 에탄올의 생산성 저해를 가져오는 주요인으로 해석된다.

최대 에탄올 농도와 생산성에 미치는 온도의 영향을

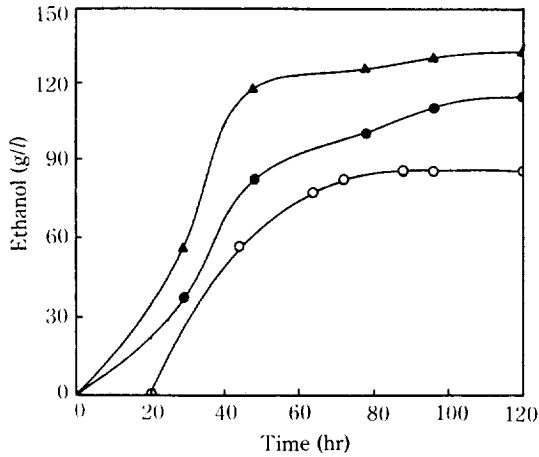


Fig. 8a. Ethanol concentration vs. time in extractive fermentation of 400 g/l of glucose solution by free (○) and immobilized cells. (●) pH 4.5, (▲) pH 5.8

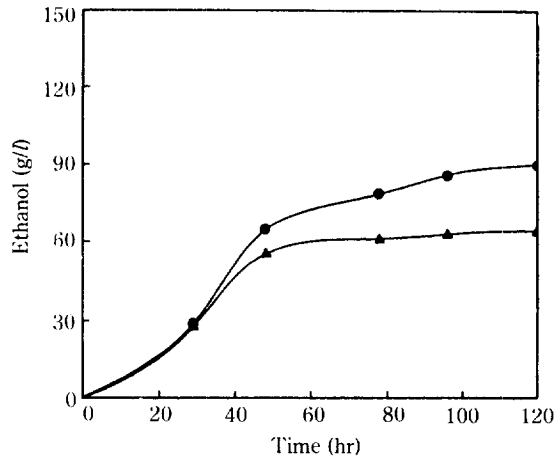


Fig. 9. Ethanol concentrations in aqueous phase. (●) pH 4.5, (▲) pH 5.8

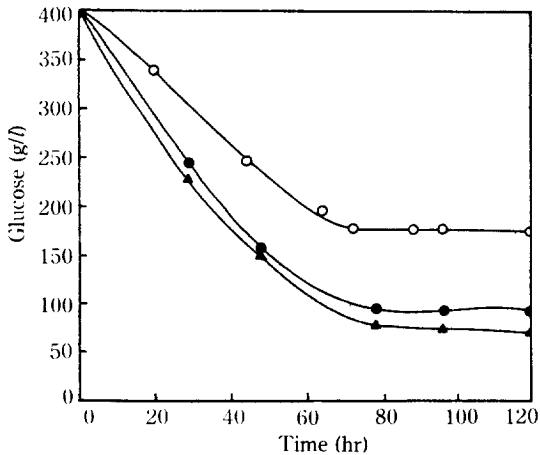


Fig. 8b. Glucose concentration vs. time in extractive fermentation of 400 g/l of glucose solution by free (○) and immobilized cells. (●) pH 4.5, (▲) pH 5.8

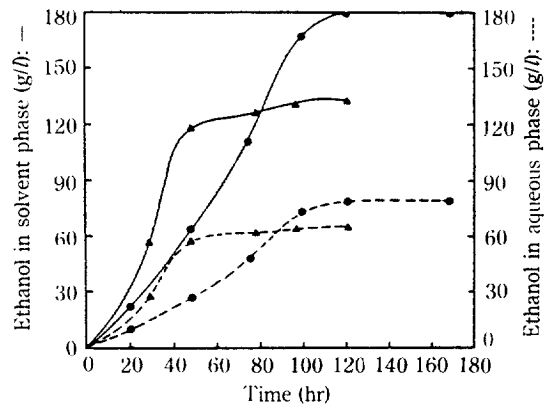


Fig. 10. Extractive fermentation of 400 g/l of glucose solution at pH 5.8 and different temperatures. (●) 25°C, (▲) 30°C

고찰하기 위해 25°C와 30°C에서 pH 5.8로 조절한 400 g/l 포도당 농도의 발효배지에서 추출발효를 수행하였으며, 배양시간에 따른 총 에탄올 농도와 수용액상에서의 에탄올 농도를 Fig. 10에 나타냈다. 25°C 배양에서의 평균 생산성은 1.9 g/l-hr였으며 90시간 동안 발효가 활발히 진행되어 총 에탄올 농도가 170 g/l(수용액상의 에탄올 농도 70 g/l)를 넘으면서 발효 생산성이 둔화되어 110시간 후 최대 에탄올 농도인 180 g/l(수

용액상 에탄올 농도 75 g/l)에 도달했다. 반면에 30°C의 배양에서는 평균생산성이 2.4 g/l-hr로 25°C 배양때 보다 생산성은 다소 높았으나 50시간후 수용액상의 에탄올 농도가 62 g/l에 도달하면서 발효는 중단되었으며 최대 에탄올 농도도 135 g/l로 낮았다. 이렇게 온도가 낮아짐에 따라 최대 에탄올 농도가 증가하는 것은 온도저하에 따른 용매의 추출능력 향상에 기인하는 것으로 해석할 수 있으며 수용액상에서의 최대 에탄올 농도가 거의 차이가 없다는 사실이 이를 뒷받침한다. 또한 30°C에서 더 높은 생산성을 갖는 것은 온도의 증가에 따른 균체의 활성도 증가때문으로 생각되며 Bajpai와 Margaritas 등이 고정화 *Kluyveromyces marxianus*를 이용

한 에탄올 발효에서 고정화 균체의 생산성은 온도의 증가에 따라 높아진다고 보고한 사실과 일치한다[12, 13].

에탄올의 발효에서는 발효계의 생산성 뿐만 아니라 최종 에탄올 농도와 수율 등도 발효계의 효율성 결정의 중요한 인자들이다. 특히 에탄올의 분리를 고려할 때 높은 농도의 에탄올을 얻을 수 있는 pH 5.8, 25°C를 최적 추출발효 조건으로 제안하고자 한다.

#### 4. 결 론

Ca-alginate에 고정화시킨 *S. cerevisiae*를 이용한 에탄올 추출발효에서 온도와 pH가 에탄올 생산성 및 최대 에탄올 농도에 대한 영향 연구를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고정화 효모를 이용한 발효의 최적 pH와 온도는 pH4.5와 35°C였으나 pH4.2-5.8, 온도 25-35°C에서 pH, 온도 변화에 따른 에탄올의 생산성 변화는 매우 완만하였다.

2. 선택된 추출용매의 에탄올 추출능력은 온도와 pH의 함수로써 pH4.2-5.8, 온도 25-35°C에서 pH증가와 온도 감소에 따라 증가하여 pH 5.8, 온도 25°C에서 최대 추출능력인  $K=1.29$ 를 가졌다.

3. 고정화 효모를 이용하여 400 g/l의 포도당 용액을 추출발효하였을 때 최적 pH와 온도는 pH5.8, 25°C였으며 얻어진 최대 에탄올 농도와 생산성은 180 g/l와 1.9 g/l-hr이었다. 이 값은 자유 효모와 고정화 효모의 최적 발효조건으로 지금까지 사용하였던 pH4.5, 30°C [1]에서 추출발효시 얻을 수 있었던 최대 에탄올 농도와 생산성인 110 g/l와 1.6 g/l-hr에 비해 각각 60%와 20% 정도 상승하였다. 이런 최대 에탄올 농도의 증가는 수용액상에서 에탄올 농도가 보다 낮게 유지되어 발효가 생성된 에탄올에 의하여 지해 받지 않았기 때문이라고 해석할 수 있다.

4. 본 연구는 고정화 효모를 이용한 에탄올 추출발효에 대해 수행됐으나, 이와 같은 최적 pH와 온도의 이동은 고정화 균체를 이용한 모든 생물물 억제형태의 추출발효계에서 고려되어야 한다.

#### 감 사

본 연구는 1990년도 고려대학교 교수특별연구비에 의해 수행된 것으로서, 고려대학교 당국에 감사드립니다.

#### NOMENCLATURE

- $H_v$  : heat of vaporization [cal/mol]  
 $K$  : ethanol distribution coefficient [=Ethanol concentration in organic phase/Ethanol concentration in aqueous phase]  
 $M$  : molecular weight  
 $P$  : maximum specific ethanol production rate by free cells with solvent extraction [g/l-hr]  
 $P$  : maximum specific ethanol production rate by free cells [g/l-hr]  
 $R$  : gas constant [0.082 / atm/K mol]  
 $T$  : temperature  
 $V$  : initial reaction rate [g/l-hr]  
 $v$  : volume

#### Greek Letters

- $\alpha$  : selectivity  
 $\delta$  : solubility parameter [cal/m<sup>2</sup>]<sup>1/2</sup>  
 $\rho$  : specific gravity [g/ml]

#### REFERENCES

- Wilde, C.R., Yang, R., Sciamanna, A. and Freitas, R.: *Biotech. Bioeng.*, **23**, 163 (1981).
- Lencki, R.W., Robinson, C.W. and Young, M.M.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **13**, 617 (1983).
- Wang, H.Y., Robinson, F.M. and Lee, S.S.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **11**, 555 (1981).
- Udriot, H., Ampuero, S., Marison, I.W. and Stocker, U.V.: *Biotech. Letters*, **11**, 509 (1989).
- Pye, E.K. and Humprey, A.E.: Proc. 3rd Annual Biomass Energy Systems Conference, Golden, Colorado, June (1979).
- Minier, M. and Goma, G.: *Biotech. Bioeng.*, **24**, 1565 (1982).
- Matsumura, M. and Markl, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 371 (1984).
- Kollerup, F. and Daugulis, A.J.: *Can. J. Chem. Eng.*, **63**, 919 (1985).
- Kim, J.H., Chun, S.B., Lee, K.Y. and Kim, D.W.: *Korean J. Biotech. Bioeng.*, **4**, 21 (1989).
- Barros, M.R.A., Cabral, J.M.S. and Novais, J.M.: *Biotech. Bioeng.*, **29**, 1097 (1987).
- Souders, M., Pierotti, G.J. and Dunn, C.L.: in "The History of Penicillin Production, Chem. Eng. Prog. Symp. Ser.", 66(100), Chapter V (1970).
- Bajpai, P. K. and Margaritis, A.: *Biotech. Bioeng.*, **30**, 306 (1987).
- Bajpai, P.K. and Margaritis, A.: *Biotech. Bioeng.*,

- 28**, 824 (1986).
14. Takata, I., Yamamoto, K., Tosa, T. and Chibata, I.: *Enzyme Microbial Technol.*, **2**, 30 (1980).
  15. Nabe, K., Izuo, N., Yamada, S. and Chibata, I.: *Appl. Environ. Microbial.*, **38**, 1956 (1979).
  16. Lee, C.W. and Chang, H.N.: *Biotech. Bioeng.*, **29**, 1105 (1987).
  17. Cho, H.S.: M.S. Thesis, Korea Univ., (1986).