

JAERI-M
82-063

放射線重合法で作製した多孔性担体を用いた酵母の固定化

1982年6月

藤村 卓・嘉悦 勲

JAERI-M レポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。

入手の間合わせは、日本原子力研究所技術情報部情報資料課（〒319-11 茨城県那珂郡東海村）あて、お申しこしてください。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-11 茨城県那珂郡東海村 日本原子力研究所内）で複写による実費頒布をおこなっております。

JAERI-M reports are issued irregularly.

Inquiries about availability of the reports should be addressed to Information Section, Division of Technical Information, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-11, - Japan.

© Japan Atomic Energy Research Institute, 1982

編集兼発行 日本原子力研究所
印 刷 日立高速印刷株式会社

放射線重合法で作製した多孔性担体を用いた酵母の固定化

日本原子力研究所高崎研究所開発部

藤村 卓・嘉悦 勲

(1982年5月22日受理)

放射線重合法を2回用いて酵母の固定化を行なった。まず、ガラス化性モノマーを用い、低温放射線重合法によって、種々の組成の、多孔性の高分子担体を作製した。この高分子担体と酵母培養液を共に24時間程度好氣的に振盪培養することにより、酵母を担体表面にしみ込ませた。次に低濃度のモノマーを担体にしみ込ませ、放射線重合により酵母を固定化した。固定化した酵母のエタノール生産能力の最大値は、固定化物と同様に好氣的に培養することによって増殖させた固定化しない酵母の生産能力の最大値の約10倍に達した。固定化酵母の高い活性は480時間以上にわたって持続した。これらのことから、固定化酵母を好氣的に培養することによって固定化物の内部で酵母が増殖し、長時間活性が維持されることが明らかとなった。このように増殖した固定化酵母を用いて発酵反応を行なわせると、180分ですべてのグルコースがエタノールに変換され100%のエタノール収率が得られた。これに対し固定化しない酵母では同じ時間において約15%のエタノール収率であった。これにより増殖固定化物のはっきりした優位性がわかる。また不織布を担体とした室温放射線重合法による酵母の固定化についても検討し、不織布の孔のサイズと固定化物の活性との関係を明らかにした。

Immobilization of Yeast Cells with Various Porous Carriers
by Radiation-Induced Polymerization

Takashi FUJIMURA and Isao KAETSU

Division of Development,
Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment,
JAERI

(Received May 22, 1982)

Yeast cells were immobilized by radiation-induced polymerization in twice. Various kinds of porous polymer carriers were prepared by radiation-induced polymerization of glass-forming monomers at a low temperature. Precultured yeast cells were incubated aerobically at 30°C with these porous carriers for 24 h. Porous carriers with yeast cells were immersed in low concentration monomer solution. Yeast cells were immobilized by radiation-induced polymerization. The maximum ethanol productivity in immobilized yeast system was around 10 times as much as that in free yeast cell system. High activity of immobilized yeast cells was maintained more than 480 h. The growth of yeast cells in immobilized yeast cells during aerobical incubation was indicated. Immobilized yeast cells thus grown were incubated for fermentation reaction. In this immobilized system, 100% of glucose was converted to ethanol, that is 100% ethanol yield was obtained, within 180 min. In free cell system, only 15% ethanol yield was obtained within 180 min. These results indicates clearly the superiority of immobilized growing cell. Yeast cells were also immobilized with non woven material as carrier by radiation-induced polymerization. The relationship between pore size of non woven material and activity in immobilized yeast cells was made clear.

Keywords: Radiation-Induced, Polymerization, Yeast, Immobilization, Porous Carrier, Low Temperature, Non Woven Material.

目 次

1. 序 論	1
2. 材料と方法	1
2.1 微 生 物	1
2.2 低温放射線重合法による酵母固定化用担体ポリマーの作製	2
2.3 室温放射線重合法による酵母の固定化とその増殖	2
2.4 不織布を担体とした室温放射線重合法による酵母の固定化	2
2.5 分析方法	2
3. 結果と議論	3
3.1 低温放射線重合法による酵母固定化用担体ポリマーの作製	3
3.2 室温放射線重合法による酵母の固定化とその増殖	3
3.3 不織布を担体とした室温放射線重合法による酵母の固定化	5
4. 結 論	5
文 献	6

Contents

1.	Introduction	1
2.	Materials and Methods	1
2.1	Microorganisms	1
2.2	Preparation of carrier for immobilization of yeast cells by radiation-induced polymerization at low temperature.....	2
2.3	Immobilization of yeast cells by radiation- induced polymerization at room temperature and multiplication of immobilized yeast cells.....	2
2.4	Immobilization of yeast cells with non woven materials by radiation-induced polymerization at room temperature.....	2
2.5	Analytical Method	2
3.	Results and Discussion	3
3.1	Preparation of carrier for immobilization of yeast cells by radiation-induced polymerization at low temperature.....	3
3.2	Immobilization of yeast cells by radiation- induced polymerization at room temperature and multiplication of immobilized yeast cells.....	3
3.3	Immobilization of yeast cells with non woven materials by radiation-induced polymerization at room temperature.....	5
4.	Conclusion	5
	References	6

1. 序 論

最近、エネルギー危機を契機として、燃料として用いるエタノールを安価に、かつ、効率的に生産するシステムに対する社会的要請が急速に高まっている。

アメリカを主とする諸外国では、とうもろこしなどの余剰農産物からエタノールを作ったり、またエタノールを得ることを目的とした農業が試みられ、実用化されつつある。

しかし、日本のように国土が狭く、食糧の自給率の低い国においては、このようなエタノール取得を目的とした農業を行なう余裕はない。これに対して農業生産において副産物として生成し、従来その多くが捨てられていたものに、もみがらなどの農産廃棄物がある。

我々はこの農産廃棄物である、もみがらなどのセルロース系廃資源を、セルラーゼによる酵素反応によって糖に変換し、この糖を酵母によって、エタノールに変換するプロセスへの放射線利用を検討してきた。¹⁾ そして放射線を用いて固定化した酵母について、酵母による発酵反応を連続化する目的で検討し、先に報告した。²⁾ この固定化法は親水性の担体に酵母の培養液を浸み込ませ、次に、担体に放射線重合性モノマーを浸み込ませて放射線重合し、生成したポリマーと担体によって酵母を固定化する方法であった。この方法によって、固定化しない酵母の約3倍の活性が得られた。しかしこの場合、担体は既存のものを使っているため、担体の性質等を自由に変えることができない。

担体の性質は固定化酵母の増殖および活性にきわめて大きな役割を果たすであろうと考えられる。従って、種々の性質の異なる担体を自由に作り得ることが望ましい。我々が長年にわたって研究して来た低温放射線重合法によれば、モノマーの組成等により、種々の性質の担体を作ることができる。³⁾ さらに低温放射線重合法によれば、様々な種類の多孔質の担体を作ることができる。³⁾ この多孔性は酵母の固定化において重要なことである。

そこで、本研究では、種々のモノマー組成で低温放射線重合法により担体を作り、この担体に酵母を浸み込ませ、次に、モノマーを浸して放射線重合し、固定化する方法を検討した。

2. 材料と方法

2.1 微生物

酵母は *Saccharomyces formosensis* を用いた。酵母を好氣的条件、30℃で、1%グルコース、0.1%糖蜜、0.5%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキスを含む前培養培地 (PH 4.8) で24時間前培養した。

1. 序 論

最近、エネルギー危機を契機として、燃料として用いるエタノールを安価に、かつ、効率的に生産するシステムに対する社会的要請が急速に高まっている。

アメリカを主とする諸外国では、とうもろこしなどの余剰農産物からエタノールを作ったり、またエタノールを得ることを目的とした農業が試みられ、実用化されつつある。

しかし、日本のように国土が狭く、食糧の自給率の低い国においては、このようなエタノール取得を目的とした農業を行なう余裕はない。これに対して農業生産において副産物として生成し、従来その多くが捨てられていたものに、もみがらなどの農産廃棄物がある。

我々はこの農産廃棄物である、もみがらなどのセルロース系廃資源を、セルラーゼによる酵素反応によって糖に変換し、この糖を酵母によって、エタノールに変換するプロセスへの放射線利用を検討してきた。¹⁾ そして放射線を用いて固定化した酵母について、酵母による発酵反応を連続化する目的で検討し、先に報告した。²⁾ この固定化法は親水性の担体に酵母の培養液を浸み込ませ、次に、担体に放射線重合性モノマーを浸み込ませて放射線重合し、生成したポリマーと担体によって酵母を固定化する方法であった。この方法によって、固定化しない酵母の約3倍の活性が得られた。しかしこの場合、担体は既存のものを使っているため、担体の性質等を自由に変えることができない。

担体の性質は固定化酵母の増殖および活性にきわめて大きな役割を果たすであろうと考えられる。従って、種々の性質の異なる担体を自由に作り得ることが望ましい。我々が長年にわたって研究して来た低温放射線重合法によれば、モノマーの組成等により、種々の性質の担体を作ることができる。³⁾ さらに低温放射線重合法によれば、様々な種類の多孔質の担体を作ることができる。³⁾ この多孔性は酵母の固定化において重要なことである。

そこで、本研究では、種々のモノマー組成で低温放射線重合法により担体を作り、この担体に酵母を浸み込ませ、次に、モノマーを浸して放射線重合し、固定化する方法を検討した。

2 材料と方法

2.1 微生物

酵母は *Saccharomyces formosensis* を用いた。酵母を好氣的条件、30℃で、1%グルコース、0.1%糖蜜、0.5%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキスを含む前培養培地 (PH 4.8) で24時間前培養した。

2.2 低温放射線重合法による酵母固定化用担体ポリマーの作製

メトキシポリエチレングリコール、メタクリレート (M-23G)、アクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEA) などの低温ガラス化性モノマーと水を、種々の組成で混合し、 -78°C で ^{60}Co からの γ 線を $1 \times 10^6 \text{ rad/h}$ の線量率で 1 時間照射して、ポリマー担体を作製した。場合によってはモノマー、水の他に、 K_2HPO_4 、グルコースなども加えた。作製したポリマーを適当な大きさに切断した後、多量の水と共に 3 日間常温で振盪した。この担体を 120°C で 30 分高圧蒸気滅菌した。

2.3 室温放射線重合法による酵母の固定化とその増殖

低温放射線重合法により作製し、高圧蒸気滅菌したポリマー担体を用いて室温放射線重合法により酵母を固定化した。低温放射線重合により作製したポリマー担体を、前培養した酵母と完全培地の混合溶液に浸して 30°C で好氣的条件で激しく振盪した。24 時間培養後、担体を取り出し、5% M-23G 溶液の中に 1 分間浸して取り出した。この試料に ^{60}Co からの γ 線を $5 \times 10^4 \text{ rad/h}$ の線量率で、室温にて 1 時間照射した。試料を完全培地で良く洗浄し、完全培地と共に 30°C で好氣的条件下で激しく振盪しながら培養した。完全培地の組成は、12% グルコース、1% 糖蜜、0.15% 酵母エキス、0.25% NH_4Cl 、0.55% K_2HPO_4 、0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% NaCl 、0.001% CaCl_2 および 0.3% 乳酸 (pH 4.8) である。一定期間培養した後、固定化物を完全培地で良く洗浄し、等体積の完全培地を加えて 30°C で 1 時間ゆっくりと振盪した。発酵反応によって、グルコースから生成したエタノールを定量する方法で活性を測定した。

2.4 不織布を担体とした室温放射線重合法による酵母の固定化

各種の密度を持つ不織布を 1 cm 角のブロック状に切り出し、 120°C で 30 分高圧蒸気滅菌した。このブロック状の不織布に酵母の前培養液をしみこませた。次に、10% M-23G 溶液をしみこませ無菌条件下で ^{60}Co からの γ 線を $5 \times 10^4 \text{ rad}$ 室温で照射し固定化した。この固定化した酵母を 2.3 と同様の方法で好氣的に培養し一定期間培養した後、固定化物を等体積の完全培地と共に 30°C で 1 時間ゆっくり振盪した。発酵反応によって、グルコースから生成したエタノールを定量する方法で活性を測定した。

2.5 分析方法

生成したエタノールは、アルコールデヒドロゲナーゼ⁴⁾ を用いて定量した。

3 結果と議論

3.1 低温放射線重合法による酵母固定化用担体ポリマーの作製

低温ガラス化性モノマーと水を種々の組成で混合し、 -78°C で ^{60}Co からの γ 線を 1×10^6 rad/h の線量率で1時間照射し、重合させた。場合によっては、モノマー・水の他に酵母の増殖に促進効果のある K_2HPO_4 や、酵母による発酵反応の基質であるグルコースなども加えた。作製したポリマー担体を適当な大きさに切断した後、多量の水とともに3日間常温で振盪した。大部分の担体は水に大きな膨潤性を示し、試料の体積は著しく増大した。また担体の強度、弾性が大であるものも得られた。

3.2 室温放射線重合法による酵母の固定化とその増殖

前節で低温放射線重合法で作製した、多種の多孔性高分子担体を用いて材料と方法の節で述べたような室温放射線重合法により酵母を固定化した。

少量の酵母を捕捉した固定化物を完全培地と共に 30°C にて好氣的条件下で激しく振盪しながら培養した。24時間毎に担体を取り出し、完全培地で良く洗浄した後、新しい完全培地と交換した。

各種の長さの好氣的培養期間(A)の後、担体の一部を別の滅菌した三角フラスコに移し、完全培地で良く洗浄した。これは好氣的条件下で培養した時に副成的に生成したアルコールを取り除き、また担体表面に付着している酵母を除去するため、完全培地を3回換えて担体を良く洗浄した。洗浄した担体と同体積の完全培地と共に 30°C で1時間ゆっくりと振盪して発酵反応をさせた。1時間反応後、生成したエタノール濃度(B)を定量した。1時間の発酵で生成したエタノール濃度(B)と激しく振盪する好氣的条件下での培養時間(A)との関係を調べた。結果を図1~3に示す。

好氣的条件下での培養時間(A)が増加すると、1時間の発酵で生成するエタノール濃度は急速に増加した。各種の担体の組成によって詳細な結果は異なるが、一般的に72~120時間好氣的に培養した後は、1時間の発酵で得られるエタノール濃度は3.0~0.6%に達した。

(図1~3参照) エタノール濃度が1%以上になる試料では、担体表面から激しい炭酸ガスの発生が観察され、このガスの発生はエタノール濃度が高くなる程激しくなった。最も良い結果を与えた試料では24時間毎に完全培地を交換し、培養を続けると、480時間以上にわたって1時間の培養で2%程度のエタノール濃度を与える。高い活性が持続した。(図3参照)

対照試料として、多孔性高分子担体と共存させた酵母と同数の酵母を滅菌した三角フラスコに移し、完全培地を用いて担体と同じ方法で、好氣的条件下で激しく振盪しながら培養した。ある一定期間(A') 培養した後、酵母を含む完全培地を別の滅菌した三角フラスコに移し、同体積の新しい完全培地と共に1時間ゆっくりと振盪して発酵反応をさせ、エタノール濃度(B')

を定量した。好氣的に激しく振盪した期間(A') と固定化しない酵母によって生成したエタノール濃度(B') との関係を図1～3に示した。図1～3に示すように固定化しない酵母において、1時間の発酵後のエタノール濃度の最大値は0.3%であった。これに対して、固定化酵母における最大アルコール生産能力は、1時間発酵後3%であったから、対照の固定化していない酵母の生産能力の10倍であることがわかる。

図4にM-23G 1, HEA 1, 水4の組成による多孔性担体を用いた固定化酵母による発酵反応のTime conversion curve を示した。この場合も固定化酵母と同体積の完全培地を加えて、ゆっくりと振盪しながら培養して、生成したエタノールを定量した。図からわかるように、固定化酵母の場合、180分でエタノール濃度が6.5%となり、グルコースが100%エタノールに変換された。これに対し固定化しない酵母では、同じ時間において、エタノール濃度は約1%となり、約15%のグルコースが変換されるにすぎなかった。この結果により、はっきりした固定化増殖酵母の優位性がわかる。

図5に固定化物の写真を示す。固定化担体の表面に層をなして酵母が増殖している様子がわかる。(図5矢印の部分) また矢印の部分には炭酸ガスの泡が見える。

図3に示したように、固定化酵母を用いて1時間の発酵でエタノールを生産させると最大3%のエタノール濃度が得られた。この値は、固定化しない酵母の値0.3%の約10倍である。酵母のエタノール生産能力は、酵母の数と酵母の比生産能力(単位酵母当りの生産能力)の積に比例する。固定化した酵母の比生産能力が、固定化しない酵母の能力より高くなることはないであろう。本研究において、固定化した酵母では、酵母と基質との接触が担体によって多少妨げられて、比生産能力が固定化しない酵母の能力よりも少ないことも有り得る。こう考えると、本研究の固定化酵母における一定体積内の酵母の数の10倍に等しいか、またはそれ以上になると思われる。これらの結果は本研究において、担体の中で酵母が固定化しない酵母よりもはるかに密に増殖していることを示している。

低温放射線重合法で作成した固定化担体のうち、水に対する膨潤度が高く、また、弾性が高く、かつ担体としての強度が大であるもの程、担体に酵母、モノマーをしみ込ませ、放射線重合により作製した固定化物の活性が高くなる傾向が見られた。おそらく、このような担体の性質が酵母の増殖に適しているものと思われる。

担体に酵母をしみ込ませた後、さらにモノマーをしみこませ、放射線重合すると、ポリマー担体表面にポリマーがさらに重なって凹凸を与え、また担体内部からの酵母の脱離を抑える結果になっている。この場合、放射線の線量は 5×10^4 rad と少なく、重合速度の高い室温で重合しても重合は完結していない。このため担体表面全体が極めて軟らかい状態になっており、このことが酵母の生育に良い結果を与えていると思われる。また、モノマー濃度が5%と極めて低く、担体に、さらにモノマーをしみ込ませることによってできた表面ポリマー層は極めて薄く、担体内部への基質(グルコース)の拡散を容易にし、酵母の増殖を活発にしている。

本実験で、固定化しない酵母の10倍の活性が得られたが、これは前の報告²⁾において既存の親水性担体を用いた場合の3倍をはるかにしのぐものである。このことは、低温放射線重合法で作製した多孔質かつ水に極めて良く膨潤する担体が、酵母の固定化および増殖に適していることを示している。また、固定化した酵母が、固定化しない酵母の10倍の活性を示したが、

この倍率は、現在知られている酵母の固定化法の中で最も高い値である。千畑ら⁵⁾の倍率と同じである。

3.3 不織布を担体とした室温放射線重合法による酵母の固定化

酵母固定化担体にとって多孔性であることが1つの必要条件であることが3.2で明らかとなったが、この孔の大きさが酵母の固定化および増殖にどのような影響を与えるかを検討するために、不織布を担体とした酵母の固定化を行った。種々の目で見える程度の大きさの孔を持つ不織布に酵母とモノマーをしみ込ませ室温で放射線重合を行って、固定化し、酵母の活性の高さの変化を検討した。結果を表Iに示す。表Iで不織布の最も大きな孔は直径0.5 mm程度、最も小さな孔で0.05~0.1mm程度である。表Iからわかるように孔の大きさが小さい担体程高い活性を与えている。この結果、この実験における範囲内では、孔が小さい程酵母の脱離が少ない。また最も孔が小さい担体でも孔気的な酵母の培養に必要な酸素は十分供給されていることを示している。

現在、我々のグループでは糸状菌であるセルラーゼ生産菌の放射線による固定化も行っている。この場合、固定化用の担体の孔の大きさが大きい程、菌の増殖が良いようであり、⁶⁾微生物の種類によって増殖に適した担体環境が異なるという重要な知見が得られた。

4 結 論

低温放射線重合法によって作製した多孔性、かつ、水に対する膨潤度の高い担体と酵母を24時間30℃で好氣的に激しく振盪培養することにより、担体に酵母をしみ込ませた。この担体にモノマーをしみ込ませ、放射線重合することにより、酵母が固定化された。酵母は担体表面において極めて密に増殖し、固定化しない酵母の10倍の活性を示した。

この倍率は、現在知られている酵母の固定化法の中で最も高い値である。千畑ら⁵⁾の倍率と同じである。

3.3 不織布を担体とした室温放射線重合法による酵母の固定化

酵母固定化担体にとって多孔性であることが1つの必要条件であることが3.2で明らかとなったが、この孔の大きさが酵母の固定化および増殖にどのような影響を与えるかを検討するために、不織布を担体とした酵母の固定化を行った。種々の目で見える程度の大きさの孔を持つ不織布に酵母とモノマーをしみ込ませ室温で放射線重合を行って、固定化し、酵母の活性の高さの変化を検討した。結果を表Iに示す。表Iで不織布の最も大きな孔は直径0.5mm程度、最も小さな孔で0.05~0.1mm程度である。表Iからわかるように孔の大きさが小さい担体程高い活性を与えている。この結果、この実験における範囲内では、孔が小さい程酵母の脱離が少ない。また最も孔が小さい担体でも孔気的な酵母の培養に必要な酸素は十分供給されていることを示している。

現在、我々のグループでは糸状菌であるセルラーゼ生産菌の放射線による固定化も行っている。この場合、固定化用の担体の孔の大きさが大きい程、菌の増殖が良いようであり、⁶⁾微生物の種類によって増殖に適した担体環境が異なるという重要な知見が得られた。

4 結 論

低温放射線重合法によって作製した多孔性、かつ、水に対する膨潤度の高い担体と酵母を24時間30℃で好氣的に激しく振盪培養することにより、担体に酵母をしみ込ませた。この担体にモノマーをしみ込ませ、放射線重合することにより、酵母が固定化された。酵母は担体表面において極めて密に増殖し、固定化しない酵母の10倍の活性を示した。

文 献

- 1) I. Kaetsu, M. Kumakura, T. Fujimura, F. Yoshii, T. Kojima and M. Tamada, *Int. J. Rad. Phys. Chem.*, 18, 827 (1981).
- 2) 藤村 卓, 嘉悦 勲 JAERI -M 9794
- 3) 嘉悦 勲, 高分子, 26, 198 (1977)
- 4) R. Bonichsen, in "Method of Enzymatic Analysis" H. U. Bergmeyer, Ed. (Academic Press, New York, 1971) p. 285.
- 5) M. Wada, J. Kato and I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 10, 275 (1980).
- 6) 嘉悦 勲, 他 未発表

Table I The effect of pore size of carrier matrix on the activity of immobilized yeast cells.

Nonwoven Materials pore size	Activity (Alcohol Conc. %)		
	48 h	72 h	96 h
TF 150	0.34	0.67	0.07
TF 200	0	0.49	—
AF 200A	0	0.34	—
AT 200	0.04	0.39	—
AT 150	0	0.20	—
control (free cell)	0.56	0.59	—

Non woven materials were immersed in precultured yeast cells solution and 10% solution of M-23G. Samples were irradiated at room temperature up to 5×10^4 rad. The method of activity measurement was same as that in Fig. 1.

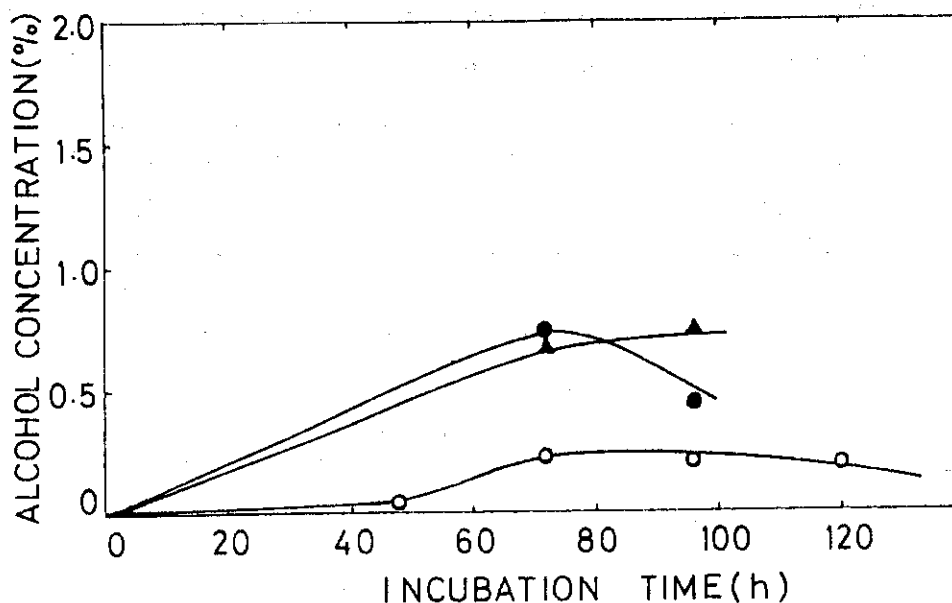


Fig. 1 The change of ethanol concentration for 1 h fermentation reaction in immobilized growing yeast cells system. Carrier matrix trapped a small number of yeast cells was incubated aerobically at 30°C for various periods(A). Immobilized yeast cells were washed well with complete medium. One hour fermentation reaction was carried out by using these immobilized yeast cells, and ethanol concentration(B) was measured. The relation between A and B is shown in this figure. As a control, free cells were incubated aerobically for various periods (A'). Alcohol concentration(B') after 1-h fermentation reaction was measured under the same conditions as immobilized yeast cells as described in text precisely.

Components of carriers:

	M-23G	HEA	water	K_2HPO_4
●	1	1	4	2
▲	1	1	2	1
○	free cell			

Method for immobilization:

Above components were mixed and irradiated up to 1 Mrad at -78°C. Resulting various porous carriers were shaken with water for 3 days. After sterilization, carriers were incubated with precultured yeast cells for 24 h. Then carriers were immersed in 5 % solution of M-23G. Samples were irradiated up to 5×10^4 rad at room temperature.

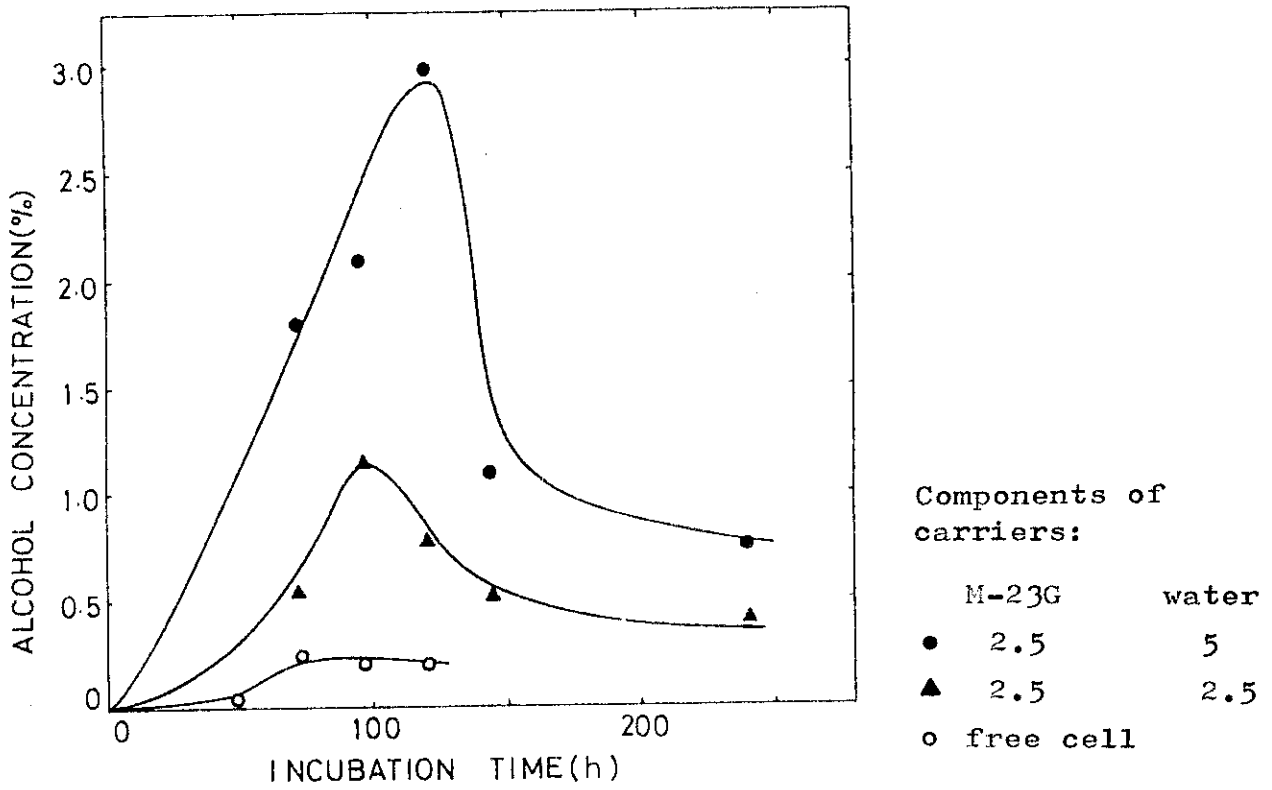


Fig. 2 Same procedure as that in Fig. 1 was carried out.

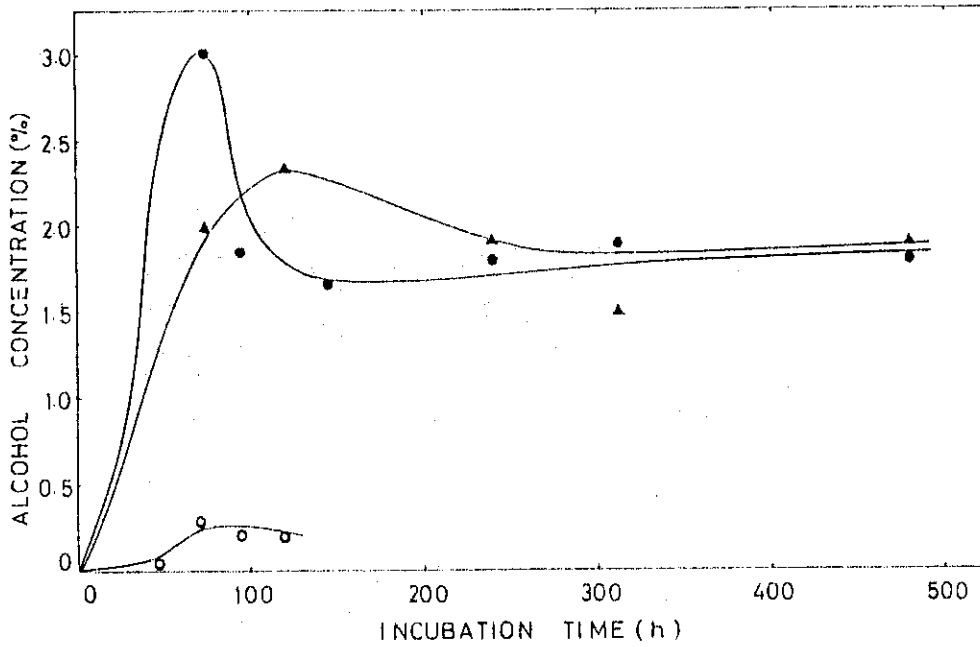


Fig. 3 Same procedure as that in Fig. 1 was carried out.

Components of carriers:

Symbol	M-23G	HEA	water
●	1	1	4
▲	1	1	2
○	free cell		

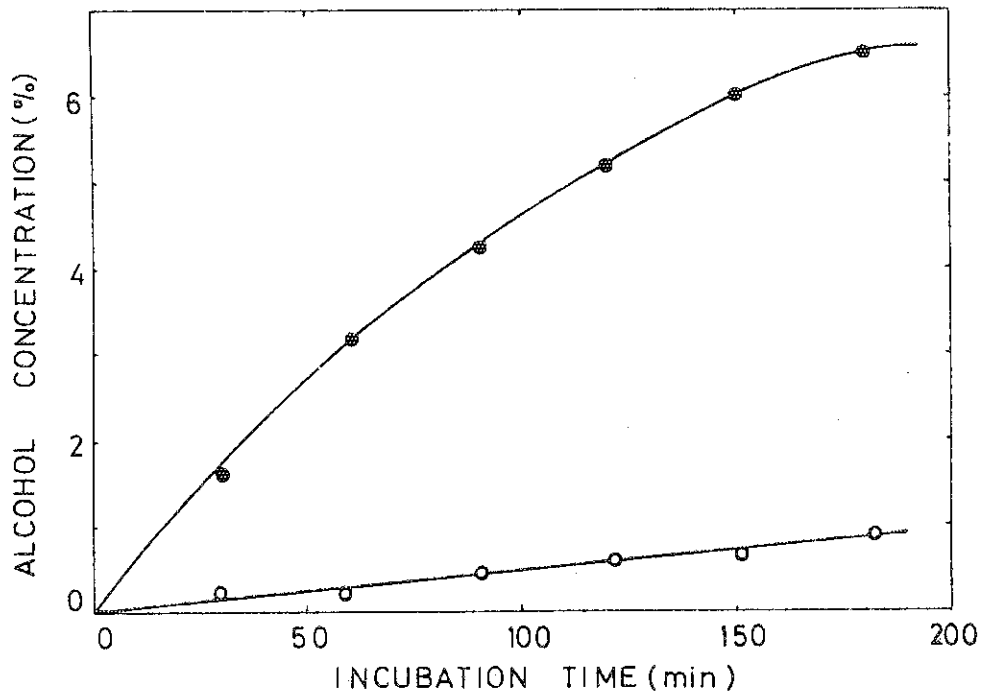


Fig. 4 Time conversion curve of fermentation reaction by immobilized and free yeast cells. Six point five % ethanol concentration means 100 % conversion of glucose. (see text)
 ● immobilized yeast cell, ○ free yeast cell.

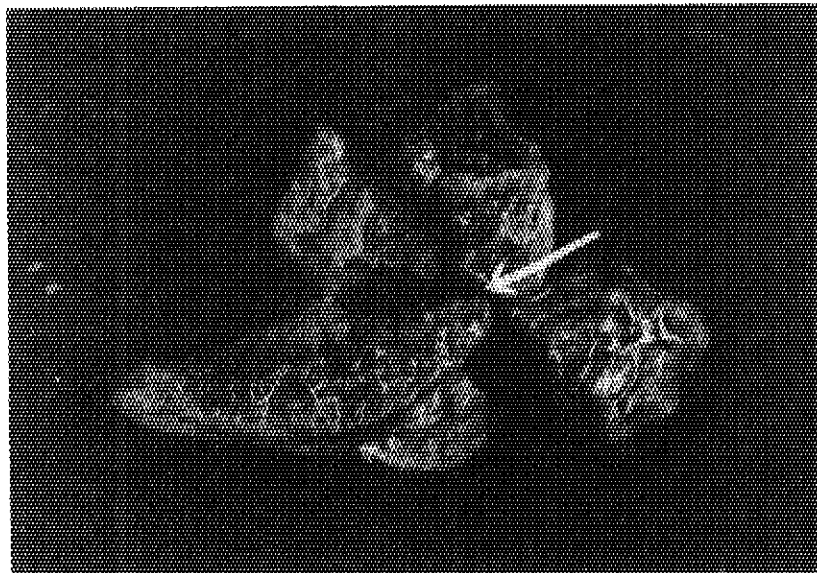


Fig. 5 Photograph of immobilized yeast cells.