

## Ca-alginate 겔 내부로의 용질의 확산특성

박종수 · 김동관\* · 이근후\*\* · 도동섭†

고려대학교 공과대학 화학공학과

\*한솔제지 기술연구소

\*\*삼성엔지니어링 화학공정개발부

(1996년 1월 9일 접수, 1996년 9월 5일 채택)

## The Diffusion Characteristics of Solute into the Ca-alginate Gel Bead

Jong Soo Park, Dong Kwan Kim\*, Khun Hu Lee\*\* and Dong Sup Doh†

Dept. of Chem. Eng., Korea Univ.

\*Dept. of Technical Research Institute, Hansol Paper Co., Ltd.

\*\*Dept. of Chem. Pro. Dev., Samsung Engineering

(Received 9 January 1996; accepted 5 September 1996)

### 요 약

회분식 혼합반응기에서 Ca-alginate 겔의 내부로 용질이 확산될 때 이에 영향을 미칠 수 있는 여러 가지 요인에 대하여 실험적으로 고찰하였다. 고려된 변수로는 용질의 종류(maltose, xylose, maltose, lactose), 온도(30-50 °C), Ca-alginate 겔의 구조에 영향을 줄 수 있는 요인인 Na-alginate 농도(1.5-4 wt%)와 CaCl<sub>2</sub> 농도(0.05M, 0.5M)이다. 시간에 따른 용액내에 용질 농도의 변화를 측정하여 이로부터 적절한 유효확산 계수를 결정할 수 있었다. Glucose와 xylose는 Na-alginate의 농도에 따른 유효확산 계수의 변화는 없었으나 maltose와 lactose는 2-3% 구간에서 급격히 변화하였다. 본 연구에서 고찰된 CaCl<sub>2</sub>의 농도범위에서는 이의 농도에 따른 영향이 없었다. 분자량이 작은 단당류(glucose, xylose)의 경우 온도에 따른 영향은 없었으나 이당류(maltose, lactose)의 경우 온도에 따른 영향이 존재하였으며, Na-alginate 2 wt%의 경우 40 °C에서 50 °C로 온도가 증가됨에 따라서 유효확산계수가 85%의 증가를 보였다.

**Abstract**—The diffusion characteristics of several solutes into the Ca-alginate gel beads have been investigated experimentally in a well mixed batch reactor. The experimental variables were concentration of CaCl<sub>2</sub>(0.05 M, 0.5 M), temperature(30-50 °C), concentration of Na-alginate(1.5-4 wt%), and the kind of solutes with different molecular weight such as glucose, xylose, maltose, and lactose, respectively. The effective diffusion coefficient was determined by measuring solute concentration in the solution with time. It was found from this experiment that the values of the effective diffusion coefficient of glucose and xylose were not affected by the concentrations of Na-alginate and CaCl<sub>2</sub>, but those of maltose and lactose were very much affected by the concentration of Na-alginate, especially in the range of 2-3%. The effect of temperature on the diffusion of glucose and xylose with relatively small molecular weight could be neglected.

*Key words: Diffusion Characteristics, Ca-Alginate Gel, Effective Diffusion Coefficient*

### 1. 서 론

세포 고정화법은 고정화를 위한 불활성 기질에 유리세포(free cell) 상태의 균주를 흡착시키거나 섞어서 고정화시키는 방법이며, 최초의 인위적 세포 고정화는 1960년에 Hattori와 Furusaka가 대장균(*E. coli*)을 Dowox.1에 흡착하여 succinic acid의 제조공정에서 사용되었다[1].

세포 고정화법은 크게 5가지로서, 지지물에 흡착시키는 법, 지지물에 공유결합시키는 법, 세포와 세포를 cross linking하는 법, 세포를 고분자에 포획하는 법, 세포를 micro capsulation하는 법 등이 있다[1]. 세포 고정화법의 여러 가지 방법 중에서, 1973년 Schovers와

Sandine이 처음 제창한 Ca-alginate 겔을 이용한 고정화법은 제조가 간편하고, 후처리가 불필요하며, 상온 상압에서 고정화가 가능하며, 많은 작용기가 있어서 사용자가 변형하기에 용이하기 때문에 다양한 공정화 기술의 적용이 가능하다는 면에서 많은 연구와 실용화가 진행 중이다[1, 2].

Ca-alginate 겔에 균주 등을 고정화하여 배양할 때 용액내의 용질이 균주가 있는 Ca-alginate 겔의 내부로 전달될 수 있어야 한다. 이와 같이 고정화입자를 사용하는 모든 공정에서 겔 입자내로 용질의 확산전달 특성에 대한 연구는 필수적으로 선행되어야 한다[3]. Ca-alginate 겔의 내부로 용질의 확산전달은 대부분 분자들의 불규칙한 운동에 의하여 발생되는 것으로서, 용액 상에서 용질의 물질전달에

대한 특성은 기상에 비해서 정확히 규명되지 않았으며 실험자료 또한 충분하지 않은 실정이다[4,5].

따라서 본 연구에서는 회분식 혼합반응기에서 용질이 확산에 의하여 Ca-alginate 겔의 내부로 전달될 때 용질의 크기, Ca-alginate 겔의 제조조건, 온도에 따른 용질의 확산전달에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

## 2. 이론적 고찰

Ca-alginate 겔의 내부로 용질이 확산될 때 용액내에 용질농도의 변화는 유효확산계수에 의존된다. 즉 시간에 따른 용질의 확산량은 De만을 매개변수로 하는 적절한 수식으로 표현될 수 있다.

### 2-1. 가정조건

본 연구의 지배 방정식은 다음과 같은 가정들을 근거로 구성하였다.

- (1) 충분한 교반으로 겔 외부의 물질전달 저항을 무시한다.
- (2) 겔 제조시 화학적 조성이 같은 겔들은 내부구조가 동일하다.
- (3) 사용된 겔들은 구형이며 직경은 일정하다.

### 2-2. 무차원 변수의 정의

$$H_s = \frac{C_i - C_r}{C_i - C_o}, \quad H_f = \frac{C_i - C_f}{C_i - C_o}, \quad \xi = \frac{r}{a}, \quad \tau = \frac{D_c t}{a^2} \quad (1)$$

여기서  $H_s$ 는 무차원 고체내 용질의 농도이며  $\xi$ 와  $\tau$ 의 함수이다.  $H_f$ 는 기질용액의 완전 혼합이 이루어진다면  $\tau$ 만의 함수이며 무차원 유체내 농도이다.  $\xi$ 는 무차원 radial distance이며,  $\tau$ 는 무차원 시간이다.

### 2-3. 지배 방정식

구형 alginate에서 중심방향의 확산만 고려한다면 시간에 따른 입자내 용질농도의 분포변화는 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{1}{r^2} \left[ \frac{\partial}{\partial r} r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right] \quad (2)$$

앞서 정의한 무차원 변수를 이용하여 지배 방정식을 구하면 다음과 같다.

(1) solid

$$\frac{\partial H_s}{\partial \tau} = \frac{1}{\xi^2} \frac{\partial}{\partial \xi} \left[ \xi^2 \frac{\partial H_s}{\partial \xi} \right] \quad (3)$$

(3)식의 경계조건은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} H_s &= 0, & \text{at } \tau < 0 \\ H_s &= H_f, & \text{at } \xi = 1 \\ H_s &= \text{finite} & \text{at } \xi = 0 \end{aligned}$$

(2) fluid

$$\frac{dH_f}{d\tau} = \frac{-3}{\alpha} \frac{\partial H_s}{\partial \xi} \quad (4)$$

식 (4)의 경계 조건은 다음과 같다.

$$H_f = 1 \quad \text{at } \tau = 0$$

여기서  $\alpha$ 는 용액과 bead들의 부피비로  $\alpha = 3V/4\pi a^3 n_o$ 이다.

식 (3)과 (4)로부터 용액내 용질의 농도는 식 (5)로 표현될 수 있다 [6].

$$C_f = \frac{C_o \alpha}{\alpha + 1} \left[ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6(1+\alpha) \exp(-D_c q_n^2 t/a^2)}{9 + 9\alpha + q_n^2 \alpha^2} \right] \quad (5)$$

## 3. 실험

### 3-1. Ca-alginate 제조

본 연구에서 사용된 고체 입자는 Ca-alginate 겔로서 D-manuronic acid와 L-guluronic acid의 copolymer로서 brown algae에서 추출한 것이다. 겔은 alginate의 guluronic acid block과 칼슘 이온간의 이온 결합에 의해 형성된다. 따라서 alginate 겔은 L-guluronic 함량에 따라서 alginate 겔의 pore 크기, 구조 등이 변화된다. 따라서 본 연구에서는 Na-alginate의 농도를 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 wt% 각각 종류수에 완전히 녹인 다음, 이 용액을 peristaltic pump를 이용하여 일정하게 가압하여 모세관을 통하여 CaCl<sub>2</sub> 용액 0.05 M, 0.5 M 수용액 중에 70 cm 높이에서 낙하시켜 일정한 직경의 Ca-alginate 겔을 제조하였다.

### 3-2. 실험장치

자켓이 부착된 혼합조 반응기에서 용질들(glucose, xylose, maltose, lactose)이 Ca-alginate 겔의 내부로 확산전달될 때 유효확산계수(effective diffusion coefficient)를 측정하기 위해 사용한 실험장치의 개략도는 Fig. 1과 같다. 반응기는 재킷형으로서 내경은 0.08 m 높이 0.11 m이며 circulator의 controller로 반응기내의 온도를 일정하게 유지하였다. 반응기내의 균일성을 유지하기 위하여 magnetic stirrer를 사용하여 충분히 교반하였다.

### 3-3. 실험방법

반응기에 증류수 200 ml를 채운 후 circulator를 이용하여 반응기내 온도를 일정하게 유지하였으며, 용질(0.5 kg/m<sup>3</sup>)을 투입한 후 충분히 교반하여 균일한 용액이 되도록 한 다음 Ca-alginate 겔 1500개를 반응기내에 일시에 투입하고 충분히 교반하여 반응기내 균일성을 유지하였다. 이때 투입한 입자 온도 또한 다른 자켓 반응기에서 기질용액 온도와 동일하도록 충분히 전 처리하여 동일한 온도를 유지하였다. Alginate가 투입된 후 일정시간 간격으로 기질용액 1 ml를 채취하였다. 채취한 기질용액에 DNS시약 3 ml를 첨가하고, 10분간 물 증탕시킨 후 15분간 상온에서 방치하고 UV-spectrophotometer로 550 nm에서 용액의 광학밀도(optical density)를 확인한다. 따라서

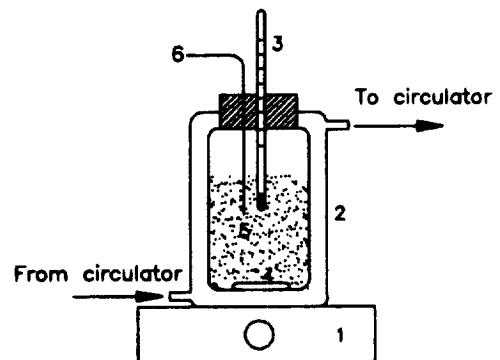


Fig. 1. Schematic diagram of experimental apparatus.

- 1. Magnetic stirrer
- 2. Jacket type beaker
- 3. Thermometer
- 4. Stirring bar
- 5. Ca-alginate gel beads
- 6. Sampling line

DNS 방법으로 얻은 용액의 광학밀도를 농도로 전환하여 용질용액에 대한 농도 자료를 얻을 수 있게 된다.

### 4. 결과 및 고찰

#### 4-1. 유효확산계수

조건이 다른 상태에서 제조된 여러 가지 Ca-alginate 입자 내부로 용질이 확산될 때 분자량이 다른 용질들의 유효확산계수를 결정하였다. 용액 중의 용질이 확산될 때 용질 확산계수는 용액의 점도, 용질의 몰랄 부피, 용매의 분자량, 용매온도 등에 영향을 받게 된다. Ca-alginate 겔의 내부로 용질이 확산될 때 유효확산계수( $D_e$ )에 가장 큰 영향을 미치는 변수로는 Ca-alginate 겔 내부의 세공 크기의 분포 (pore size distribution)와 기하학적인 구조를 들 수 있으며 이는 겔 제조시 Na-alginate 농도와  $CaCl_2$  농도에 의하여 결정된다[4, 7, 8]. 또한 용액의 온도와 용질의 분자량에 따른 분자의 크기와 기하학적인 용질의 구조에 의하여 영향을 받게 된다. 용액내에 용질의 농도는 Ca-alginate 겔 내부로 전달되는 만큼 감소하게 될 것이다. 따라서 이때 확산계수는 용액내에 용질의 농도변화를 측정함으로써 결정될 수 있으며 대표적인 결과는 Fig. 2와 같다. 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 초기에는 용매의 농도변화가 급격하여 Ca-alginate 겔 입자를 투입한 후 10분 동안에 평형값의 87%에 도달되었으며 10분 이후에는 용질의 감소율이 현저하게 감소되었다. 이와 같이 시간에 따른 용질농도의 변화를 식 (5)에 대입하여 유효확산계수( $D_e$ )를 결정할 수 있었다. 이때 식 (5)는 유효확산계수( $D_e$ )만을 매개 변수로 하는 방정식으로서, 비선형 최소자승법으로 유효확산계수( $D_e$ )를 결정할 수 있었으며 이때 regression coefficient는 모두 0.93 이상으로서 정확한 값을 얻을 수 있었다.

#### 4-2. Na-alginate 농도의 영향

균주를 고정화한 겔 입자는 어느 정도의 강도 즉 모양이 유지되어야만 각 단위공정들로 이동될 수 있게 된다[9]. 따라서 어느 정도의 강도를 유지할 수 있게 제조하기 위해서는 Na-alginate의 양을 증가시켜야 할 필요가 있게 된다. 그러나 Na-alginate의 함유량이 증가하게 되면 겔의 내부를 확산하는 용질의 이동성을 저해할 수 있는 요인으로 작용될 수 있으므로 이에 대한 고찰이 필요하다[4].

Fig. 3은 용질이 xylose일 때 Na-alginate의 농도에 따른 확산계수의 변화에 대하여 고찰한 결과이다. 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 Na-alginate의 농도 증가에 따라 확산계수값의 변화는 거의 볼 수 없었다. 이는 Na-alginate의 농도가 증가함에 따라 Ca-alginate 겔의 구

조가 복잡해지고 pore size가 작아지지만, 단당류인 xylose는 저분자 물질이기 때문에 분자구조가 비교적 단순하고 크기가 작으므로 크게 영향을 받지 않아 확산속도가 변화되지 않았기 때문이다[10]. 즉 Na-alginate의 농도가 4 wt%인 Ca-alginate 겔의 구조는 단당류의 확산이 자유로울 정도로 매우 큰 pore를 가짐을 알 수 있다. 또한 xylose와 유사한 분자량을 갖는 단당류인 glucose의 경우도 xylose와 같은 거동을 보였다.

그러나 용질의 분자량이 증가된 maltose의 확산계수는 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 저분자인 xylose와는 전혀 다른 거동을 보였다. Na-alginate 2 wt%일 때까지 동일한 확산계수를 가졌으나 3 wt% 이상의 농도가 첨가됨에 따라서 확산계수가 현저하게 감소되었다. 이는 Ca-alginate의 농도에 영향을 받을 정도로 분자의 크기가 증가되었음을 의미하는 것이며 이와 유사한 크기의 용질을 함유한 용액을 사용할 때는 Na-alginate의 농도를 결정할 때 주의하여야 함을 의미하는 것이다. 또한 실제로 이와 유사한 분자량을 갖는 lactose의 경우는 2 wt%가 첨가될 때 급격한 영향을 보였다.

#### 4-3. $CaCl_2$ 농도의 영향

Ca-alginate 겔 제조시 alginate 분자간의 결합력은  $Ca^{2+}$ 이온에 의하여 형성되는 것이므로 Ca-alginate 겔의 제조시에 첨가되는  $CaCl_2$ 의 양에 의하여 영향을 받을 수 있다[11, 12]. 따라서 이에 대한 연구를 수행한 결과 Fig. 5에서 볼 수 있는 바와 같이  $CaCl_2$  농도의 영향

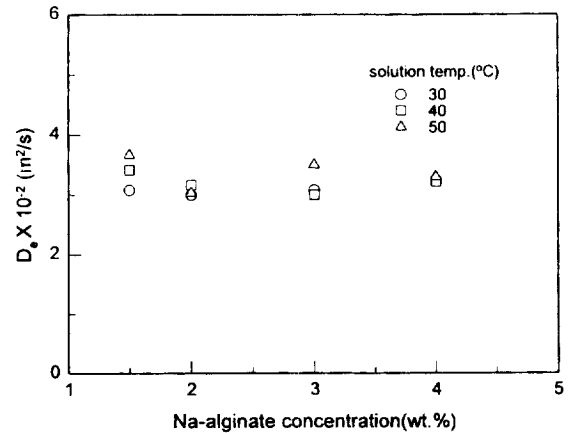


Fig. 3. The effect of the Na-alginate conc. on the effective diffusion coefficient with xylose solution.

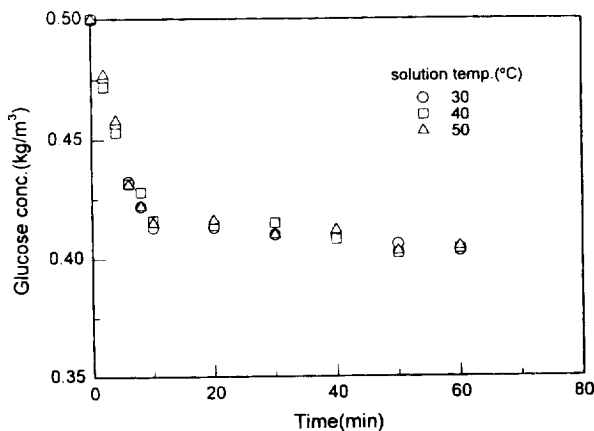


Fig. 2. The variation of glucose concentration according to time with the Na-alginate 3.0 wt. %.

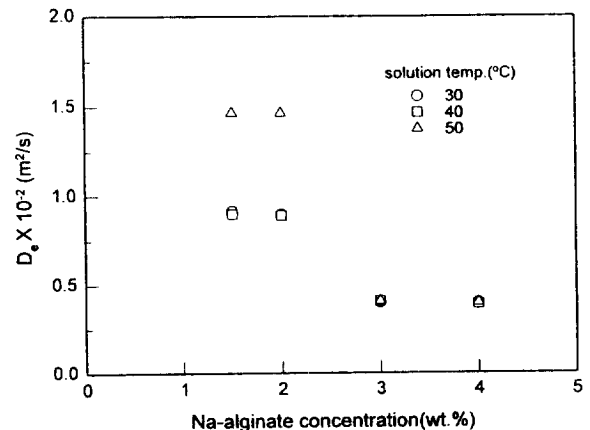


Fig. 4. The effect of the Na-alginate conc. on the effective diffusion coefficient with maltose solution.

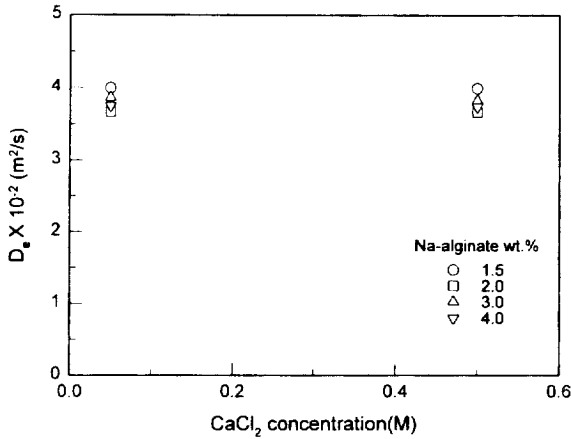


Fig. 5. The effect of CaCl<sub>2</sub> conc. on the effective diffusion coefficient with glucose solution.

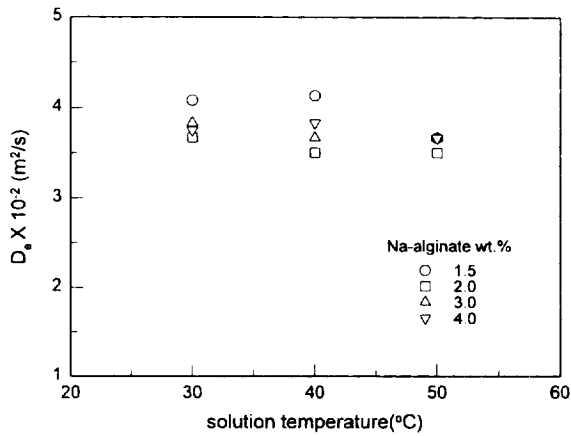


Fig. 6. The effect of solution temperature on the effective diffusion coefficient with glucose solution.

은 볼 수가 없었다. 이러한 경향은 본 연구에서 고찰한 용질들 모두 동일하였다. 이는 CaCl<sub>2</sub>농도 변화는 본 연구에서 고찰한 용질의 확산농도 변화를 유발할 수 있을 정도로 Ca-alginate 겔의 구조나 pore 직경을 크게 변화시키지 못함을 의미하는 것이다. CaCl<sub>2</sub>농도가 0.05 M보다 훨씬 작은 농도에서는 Na-alginate의 Na<sup>+</sup>이온이 Ca<sup>2+</sup>이온으로의 치환이 불안정하여 졸 상태에서 겔 상태로의 변화가 변칙적인 전이 상태 영역에서는 CaCl<sub>2</sub>의 농도가 영향을 줄 수 있지만[13] 본 실험에서는 CaCl<sub>2</sub> 농도 변화영역이 0.05-0.5M로서 완전한 구형의 Ca-alginate 겔을 형성하게 됨으로서 이에 대한 영향이 나타나지 않은 것으로 판단된다. 즉 완전한 구형이 형성될 수 있는 농도 이상이면 CaCl<sub>2</sub>에 대한 영향이 더이상 나타나지 않음을 알 수 있었다.

4-4. 온도에 따른 물질전달 특성

Glucose의 경우 온도에 따른 확산에 미치는 영향에 대하여 고찰한 결과 Fig. 6과 같다. 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 영향이 없었다. 그러나 이당인 maltose의 경우 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 alginate의 농도 1.5-2.0 wt%에서 온도가 40°C에서 50°C로 증가될 때 유효확산계수가 약 85% 정도의 증가가 나타났다. 또한 lactose의 경우도 이와 유사한 결과를 볼 수 있었다. 이와 같이 단당류와 이당류의 경우 온도에 의한 영향이 현저하게 다른 다음과 같이 설명될 수 있다.

일반적으로 묽은 용액내의 용질이 확산될 때 Wilke-Chang[5, 14] 식

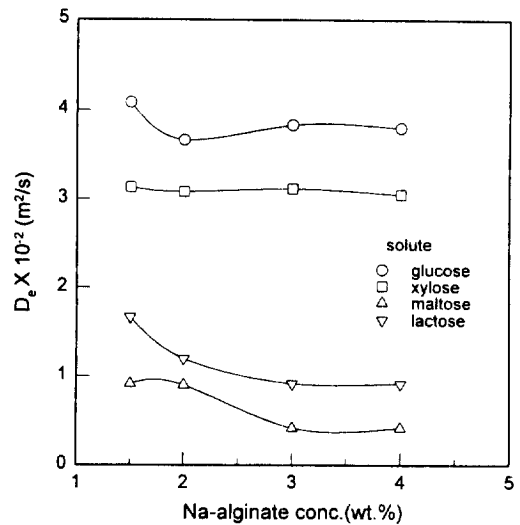


Fig. 7. The effect of Na-alginate concentration on the effective diffusion coefficient with the kind of solute at 30 °C.

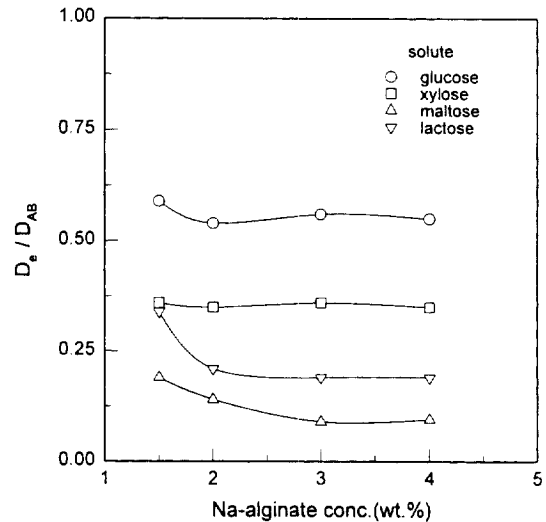


Fig. 8. Relationships between  $D_e/D_{Ab}$  and Na-alginate concentration at 30 °C.

에 의하면 확산계수는 절대온도 T에 비례하는 것으로 알려져 있다.

$$D_{AB} = 7.4 \times 10^{-8} \frac{(\Psi_B M_B)^{0.5}}{\mu_B V_A^{0.6}} \cdot T \tag{6}$$

즉 온도가 증가됨에 따라서 용질자체의 이동성이 증가되어 확산 속도가 증가된다. 그러나 Ca-alginate의 내부로 용질이 확산될 때에는 용질의 이동성의 변화뿐만 아니라 겔의 matrix구조 변화 또한 발생될 수 있다. 따라서 단순히 용질의 이동성만이 아닌 이에 대한 영향으로서 단당류와 이당류의 경우 온도에 따른 영향이 다르게 나타난 것으로 판단된다.

4-5. 용질들의 확산계수 비교

본 연구에서 용질로 사용한 물질들의 유효확산계수들의 상대적인 크기는 Fig. 7에 나타난 바와 같다. 용질의 분자량에 따라서 물질확산계수의 값이 현저하게 차이가 남을 알 수 있었으며 분자량의 크기가 두 배 정도인 단당류와 이당류간의 유효확산계수의 차이가 대략 4배 정도이었다. Glucose의 분자량은 180.16으로서 xylose보다 30

정도 큰 값을 갖지만 xylose의 경우보다도 유효확산계수값이 큰 것은 분자구조로 설명될 수 있다. 즉 glucose에는 메틸기가 존재함으로 xylose보다 미약하나마 극성이 존재하게 되며 따라서 alginate의 친수성인 성질과 동일한 형태이므로 분자량의 크기와 반대인 결과를 보인 것이다. 또한 이당류인 경우도 이와 같은 현상으로서 설명 가능할 것으로 사료된다.

본 연구에서 측정된 용질의 유효확산계수가 순수한 용액에서 확산될 때와의 상대적인 차이에 대하여 고찰하고자 유효확산계수와 분자확산계수간의 비( $D_e/D_{AB}$ )를 구한 결과 Fig. 8에서 볼 수 있는 바와 같이 glucose의 경우가 0.6으로 가장 높은 값을 보였으며 maltose의 경우는 0.1로서 순수한 용액상에서 확산될 때보다 저항이 매우 크게 되어 순수 용액상에서 확산되는 것보다 많은 영향이 존재함을 알 수 있었다. 이때 비교된 온도는 30 °C에서의 값이며 여기서 사용된 용액상에서 용질의 분자 확산계수는 Wilke-Chang[5, 14] 상관식 (6)을 사용하여 계산된 값이다.

## 6. 결 론

Ca-alginate 겔 입자의 내부로 용질들이 확산될 때 Ca-alginate 겔 입자의 제조조건과 온도에 따른 영향에 대하여 고찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

(1) 적절한 가정조건으로부터 유도된 수식과 시간에 따른 용질의 변화로부터 유효확산계수를 결정할 수 있었다.

(2) Glucose와 xylose는 Na-alginate의 농도에 따라서 확산 물질전달 저항은 없었다. 그러나 이당류인 용질(maltose, lactose)의 경우 Na-alginate 농도 2-3% 구간에서 확산계수 50% 감소가 발생되었다.

(3) 고찰된 전체 용질, alginate 농도, 온도범위에서  $CaCl_2$ 의 농도에 따른 유효확산계수에 영향이 없었다.

(4) Glucose, xylose의 경우 용액온도에 따른 용질의 유효확산계수 변화는 볼 수 없었다. 그러나 maltose, lactose의 경우 40-50 °C에서 매우 큰 영향을 받았다.

(5) 단당류 용질(glucose, xylose)의  $D_e/D_{AB}$ 은 0.6-0.4로 이당류(maltose, lactose)의 0.3-0.1값보다 크게 나타났다.

## 사용기호

a	: radius of a bead [m]
C	: concentration of solute in the solution [ $kg/m^3$ ]
$C_0$	: initial solute concentration in the solution [ $kg/m^3$ ]
$C_1$	: initial solute concentration in the Ca-alginates gel [ $kg/m^3$ ]
$C_t$	: solute concentration in the solution at time t [ $kg/m^3$ ]
$C_s$	: solute concentration in the Ca-alginates gel at time t [ $kg/m^3$ ]
D	: constant [-]
$D_e$	: effective diffusivity [ $m^2/s$ ]
$D_{AB}$	: binary diffusivity for system A-B [ $m^2/s$ ]

$H_n, H_s$	: dimensionless concentration [-]
$M_B$	: molecular weight of solvent [kg/mol]
$n_0$	: number of beads [-]
$q_n$	: non zero positive roots [-]
r	: distance from the center of a bead [m]
t	: time [s]
T	: absolute temperature [K]
V	: volume of the solution excluding the space occupied by bead [ $m^3$ ]
$V_A$	: molar volume of solute as liquid at its normal boiling point [ $m^3/kmol$ ]

**그리스 문자**

$\alpha$	: solution volume over beads volume [-]
$\xi$	: dimensionless radial distance [-]
$\mu$	: viscosity of solution [cP]
$\tau$	: dimensionless time [-]
$\psi_B$	: association parameter for solvent [-]

## 참고문헌

1. Elving, P.J. and Winefordner, J.D.: "Solid Phase Biochemistry", A Wiley-Interscience Publication, 258(1983).
2. Kierstan, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 707(1981).
3. Gray, C.J. and Dwsett, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 607(1988).
4. Tanaka, H., Matsumura, M. and Veliky, I.A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 53(1984).
5. Shintaro, F. and Minoru, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 389(1985).
6. Churchill, R.V.: "Modern Operational Mathematics in Engineering", McGraw-Hill, New York, 240(1984).
7. Wilke, C.R. and Chang, P.: *Am. Inst. Chem. Eng. J.*, **1**, 264 (1955).
8. Shere, P., Kluge, M. and Sahn, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1507(1981).
9. Martinsen, A., Brak, G.S. and Smidsrod, O.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 79(1989).
10. Husein, Q. and Iqbal, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1102(1985).
11. Cheethan, P., Blunt, K.W. and Bucke, C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2155(1979).
12. Kierstan, M., Darch, C. and Reilly, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1507(1984).
13. Peter, S.J.C., Kevin, W.B. and Christopher, B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2155(1979).
14. Horowitz, S.B. and Fenichel, I.R.: *J. Phys. Chem.*, **68**, 3378 (1964).
15. Yang, R.Y.K. and Pu, H.T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 891(1988).
16. Nguyen, A. and Luong, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2155(1986).