

고정화 미생물의 기질 유효 확산

김 광, *선우 양 일, **박 승 조

동아대학교 공과대학 화학공학과

*자연대학 생물학과

**공과대학 환경공학과

Effective Diffusivity of Substrate of an Immobilized Microorganism in Ca-Alginate Gels

Kwang Kim, Yang-Il Sunwoo* and Seung-Cho Park**

Department of Chemical Engineering,

*Department of Biology,

**Department of Environmental Engineering,

Dong-A University

ABSTRACT

The diffusion characteristics of substrate of varying biomass concentrations into and from Ca-alginate gel beads in well-stirred solutions were investigated. Ca-alginate gel bead were immobilized by *Zymomonas mobilis* or free from cells.

The values of the diffusion coefficient of substrate were calculated by means of the method of Least-squares and Random pore model.

Reaction rates are expressed by the Michaelis-Menten type equation, and the results are compared with experimental data. Intraparticle effective diffusivity of substrate resistance on reaction by using immobilized *Z.mobilis* entrapped by Ca-alginate gel seemed to be restricted by cell density.

The experimental data also indicated relationship between the effective diffusivity and the cell concentration used in the gel preparation.

서 론

단백질, 효소, 미생물 및 동식물의 세포를 포괄하기 위한 고정화방법으로 천연 또는 합성중합체가 사용되었으며 생중합체의 gel포괄에 의한 세포간질은 세포벽으로부터 유출된 다당류인 알긴산의 나트륨염을 사용하여 형성시켰다. 이 생중합체는 상대적으로 불활성인 반면에 고정화세포에 대해 무독성이며 또한 gel 형태의 생리화학적특성은 미생물이 고정화된 gel에 대한 기질의 접근을 용이하게하여 생물학적으로 활성이 있는 물질의 반응에 영향을 미친다. 그럼에도 불구하고 효소 및 미생물반응의 공업적 응용에 있어서 생체촉매의 연속적이용을 위한 미생물고정화에 관하여서는 생산조건에 필요한 생리

학적 변수의 시험이 요구되고 또한 아직 해결해야 할 문제점이 많이 남겨져 있으므로 연구보고가 많은데 비하여 일반적인 실용화는 별로 진행되지않고 있으며 그 적용범위도 극히 제한되고 있는 실정이다(1-7). 고정화균체에 대하여 Kappa-carrageenan과 Alginic acid의염 등에 의한 포괄고정화법이 많이 이용되고있다. 이중 Alginic acid는 천연고분자로서 Ca^{2+} , Al^{3+} 와 같은 다가양이온의 존재하에서 겔화될수 있어서 고정화조건이 용이하고 비교적 안정된 형태의 구형을 이룬다. 미생물반응의 중요성이 증대되는 공업적 응용은 균을 고정화하고있는 담체내부에 있어서의 물질이동이다. 담체내부에서 일어나는 반응은 외부에 의한 확산으로 침투되는 기질이 균체의 대사에 의한 반응물로 되어 담체외부로 확산되는 과정을 이룬다. 그러나 고정화균체의 활성은 담체내의 균체 자신에

의한 확산저항으로 인하여 고정화 후의 자체활성을 예측하기가 곤란하다. 더우기 균체의 체적과 담체의 체적비가 적절치 않은 경우는 균체자체의 확산이 저해되어 활성이 저하되거나 또는 균체가 물리적장해 및 담체내부의 기질, 농도분포가 다르면 담체내부에서 부분적으로 증식방법이 달라지므로 담체 중심부근의 균체의 활성이 효과적으로 이용되지 못한다(8,9). 따라서 고정화후의 균체는 적당한 영양분이 섭취될 수 있어야 담체내에서 균질하게 증식되고 또한 장기간에 걸쳐 그 활성을 유지할수 있다. 이것은 담체의 구조와 분자크기로부터 결정되는 담체기공이 생성물이나 기질의 확산에 영향을 미치게되어 반응속도가 제한받는 원인이 되고있다.

그러므로 본 연구에서는 고정화생물의 지지담체내의 물질이동현상을 규명하고 총괄반응속도는 균체의 반응속도와 담체내부의 기질과 생성물의 확산속도에 의하여 유지됨을 파악하고 또한 담체내부의 균체존재로 확산저항이 원인이 될때 균일상제조의 균체량(균체밀도)을 결정할 수 있는 최적화와 고정화미생물증식의 경향과 그 활성의 변화등에 대하여 속도론적 고찰을 행하였다.

재료 및 방법

미생물과 배양조건

사용균주는 한국종균협회로부터 분양받은 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 및 ATCC 29191을 사용하여 Table 1 에 표시된 조성의 사면배지에 30°C에서 48시간 배양된 후 4°C에서 보관하고, 매월 2회이상 계대배양하였다.

균체증식에 사용한 배양액의 조성을 Table 2.에 나타내었다. Table 2 의 Pre-seed culture medium 400ml에 10ml씩 접종시켜 30°C에서 Growth curve 결과에서 얻은 18시간으로 진탕배양시켰다.

Ca-alginate gel bead 제조(10)

기질용액에서 담체 gel내부로 확산될때 사용된 gel bead는 sodium alginate 2%(W/V)를 제조하여 1.5% CaCl₂·2H₂O 용액에 원하는 크기로 압출시켜 4°C에서 24 시간 성숙시킨 제조된 gel bead를 반응에 사용하였다. alginate는 alginic acid의 ammonium salt 또는 alkali salt로서 정의되는데 중합체 마디에 있는 -COOH 원자단은 양이온 결합 부위로서 중요한 역할을 한다.

Fig. 1의 좌측에 표시된바와같이 alginic acid의 1가 양이온결합은 선형중합체이다. alginate의 가장 중요한 유용한 특성은 다가 양이온과 교차결합에 의하여 gel을 형성하는 것이다. 고정화에 사용된 1.5% CaCl₂·2H₂O에서의 Ca²⁺과 결합하는 젤라틴화는 Fig. 1의 우측에 표시된 바와 같이 "egg-box"라고 일컫는 사슬의 3차원 망상구조에 의하여 고정화모양(shape)과 경도(hardness) 등의 특

Table 1. Medium Composition for Slant Culture (Ingredients per liter).

Bacto-Yeast Extract	10g
Bacto-Dextrose	20g
Bacto-Agar	20g

Table 2. Medium Composition for Liquid Culture (Ingredients per liter).

Yeast Extract	10g	(a)
Bacto-Dextrose	100g	(a)
KH ₂ PO ₄	1g	(b)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g	(b)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g	(b)

(a) pre-seed culture media
(b) seed culture media

성을 변화시킬수 있는 alginate(비선형구조)를 얻을 수 있다.

***Zymomonas mobilis* 고정화(11-13)**

배양된 균을 3000r.p.m.에서 15분간 원심분리하여 집균한후 증류수로 여러번 세척하고 다시 0.85% NaCl용액으로 세척한다. 이 과정에 의해 수확된 균을 탄소원인 glucose를 제외한 seed culture medium에 교반혼합하고 4% (W/V) sodium alginate와 1:1비율로 혼합시킨다. 이 gel 상태의 혼합액을 1.5% CaCl₂·2H₂O 용액에 2.2~3.6mm크기로 압출시켜 4°C에서 성숙시킨후 반응에 사용하였다.

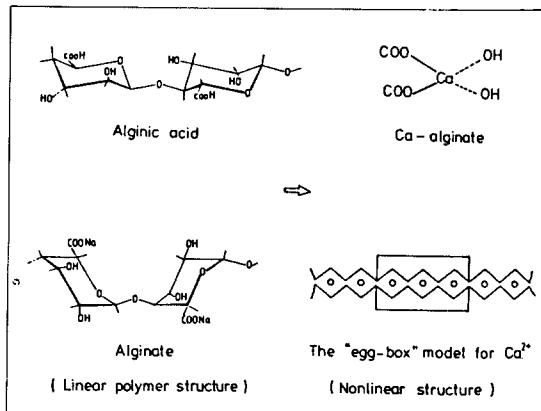
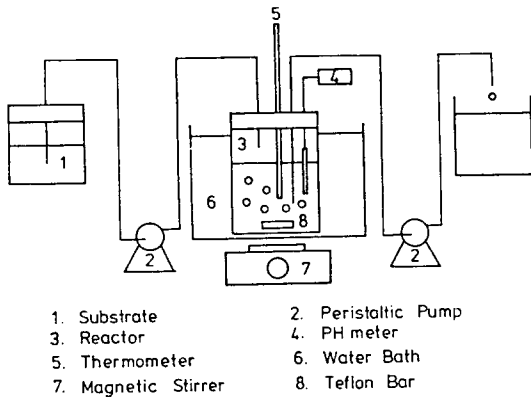


Fig. 1. Univalent and Divalent cation binding by alginic acid.

실험방법

본 실험에 사용된 반응장치는 Fig. 2에 표시했는데, 내경 8cm, 높이 15cm의 원통형으로서 magnetic stirrer에서 teflon bar에 의해 625r.p.m.으로 교반하였으며 항온조를 사용하여 30°C로 유지시켰다. 모든 반응기장치부착물 (reactor, tubing, feed tanks, teflon bar etc.)은 121°C, 15psi 압력에서 20분간 멸균하여 사용하였다. 고정화균체에 의한 실험에서의 기질용액은 gel bead의 용해를 방지하기 위하여 2.5g/l의 CaCl₂·2H₂O를 포함시켰다. 온도 30°C에서 소정시간 경과후에 sample을 채취하여 Glucose 농도, Ethanol농도 및 pH를 측정하였다. Glucose농도는 Glucose oxidase인 V-Glucose로, Galactose 농도는 Galactose oxidase로써 효소법에 의해 분석하였다. Ethanol농도는 Gas Chromatograph에 의해 분석하였는데 DEGS column은 FID detector로서 160°C에서 adsorption medium으로 사용하였다. 담체 gel내부의 균체량은 일정량의 gel bead를 10% sodium tripolyphosphate 용액에 용해하여 UV/VIS Spectrophotometer를 사용하여 620 nm에서 흡광도로부터 측정하였다. 이론값은 computer를 이용하여 Least-squares Method에 의해 구하였다.



1. Substrate
2. Peristaltic Pump
3. Reactor
4. PH meter
5. Thermometer
6. Water Bath
7. Magnetic Stirrer
8. Teflon Bar

Fig. 2. Experimental apparatus.

담체 Gel 내부의 유효 확산계수

Ca-alginate gel 담체 기공이 생물이나 기질분자확산 계수(D)의 측정은 연속유동계와 충분히 교반되는 회분식 접촉공정을 사용하여 결정할 수 있다(14-16). 효율적 유효확산계수를 측정하기위해 회분식접촉방법(17)을 이용하여 Ca-alginate gel bead에서 기질의 분자 확산계수를 기질의 농도 변화로부터 계산하였다. bead를 구형으로 보고 물질전달방정식을 세우면 다음과 같다.

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

경계조건은 다음과 같다.

$$\frac{\partial C(o,t)}{\partial r} = 0 \quad (2)$$

$$C(R, t) = KdC \quad (3)$$

$$4R^2 \cdot nD \int_0^t \frac{\partial C}{\partial r} \Big|_{r=R} dt = V(C_i - C) \quad (4)$$

담체내부의 구조가 균질하다고 하면 Crank(18)에 의하여 본방정식의 해가 다음과 같이 표시된다. 용액에서 기질의 초기농도가 C_{Lo}이고, 담체내부에 기질이 없는 경우 기질은 담체내부로 확산되어 그때 내부의 기질농도, C_p는 다음과 같이 표시된다.

$$C_p = \frac{\alpha C_{Lo}}{1 + \alpha} \left\{ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6(1 + \alpha) \exp\left(-\frac{Dq_n^2 t}{a^2}\right)}{9 + 9\alpha + q_n^2 \alpha^2} \frac{a}{r} \cdot \frac{\sin(q_n r/a)}{\sin q_n} \right\} \quad (5)$$

$$\alpha = (V/n) (4\pi a^3/3) \quad (6)$$

$$\tan q_n = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} \quad (7)$$

여기에서 a는 담체 bead의 직경, r은 bead 중심에서의 거리, t는 시간, V는 bead를 제외한 용액의 체적, n은 bead의 갯수, q_n은 식(7)의 양의 해이다.

bead주위의 액체경막저항을 무시한다면 bead표면에서의 기질의 농도, (C_p)_{r=a}는 용액의 농도, C_L와 같다. 그러므로 용액에서 기질의 농도는 식(5)에서 다음과 같이 표시된다.

$$\frac{C_L}{C_{Lo}} = \frac{\alpha}{1 + \alpha} \left\{ 1 + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6(1 + \alpha) \exp(-a^2)}{9 + 9\alpha + q_n^2 \alpha^2} \right\} \quad (8)$$

담체gel내부에 있어서 bead반경(구형으로 가정)을 변수로하여 균체의 농도변화에 따른 비정상확산을 고려하면 다음식과 같다(19).

$$\frac{\bar{C}_L}{C_{Lo}} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2 \pi^2 t}{r^2}\right) \quad (9)$$

단, \bar{C}_L =담체gel내부의 확산물질평균농도 De=담체 gel 내부에 균체가 균질하게 분포되었다고 가정할때 확산물질의 유효확산계수

$\frac{\bar{C}_L}{C_{Lo}}$ 와 $\frac{\pi^2 \cdot t}{r^2}$ 의 관계를 도식화하여 다음 식(10)에 의하여 D_e를 구할 수 있고, Random pore model을 적용하면 D_e와 담체 gel내부의 균체농도, C_c의 관계는 다음식으로도 나타낼 수 있다.

$$\frac{D_c}{D_o} = k_1(1+k_2C_c)^2 \quad (10)$$

D_o 는 glucose의 30°C 물에서의 확산계수로서 $5.01 \times 10^{-4} \text{cm}^2 / \text{min}$ 이고(20), k_1 , k_2 는 정수로서 도식적방법에 의하여 구한다.

고정화균체의 반응속도

담체내부의 물질이동의 영향을 고찰하기위하여 gel bead의 직경과 담체내부의 균체 농도 및 기질 농도를 매개 변수로하여 Michaelis-Menten형 반응속도식에 의한 촉매 유효계수를 추정하여 이론식과 비교한다. 즉 Bischoff의 Generalized modulus(21), m 를 이용하면

$$m = h \frac{\beta}{\beta + 1} \{ \beta - \ln(1 + \beta) \}^{-1} \quad (11)$$

여기에서

$$h = \frac{V_p}{S_p} \sqrt{\frac{V_{max}}{2D_c K_m}} \quad (12)$$

$$\beta = \frac{S}{K_m} \quad (13)$$

이고,

V_p 는 gel bead의 체적, S_p 는 gel bead의 표면적 V_{max} 는 최대반응속도이며 K_m 과 S 는 각각 Michaelis정수와 bulk기질 농도이다.

Michaelis-Menten형 반응의 촉매유효계수는 0차 및 1차의 유효계수에 의하여 다음식으로 추론된다(22).

즉, 유효계수, $E = (\text{실제반응속도} / (\text{담체 gel내부기질농도가 bead표면농도와 균일할때의 반응속도}))$ 라고 정의하면

0차반응의 유효계수, E_0 는

$$m \leq \frac{1}{\sqrt{3}} \text{일때 } E_0 = 1$$

$$m > \frac{1}{\sqrt{3}} \text{일때 } E_0 = 1 - \left(\frac{1}{2} + \cos \frac{\varphi + 4\pi}{3} \right)^3 \quad (15)$$

단, $\varphi = \cos^{-1} \left(\frac{2}{3m^2} - 1 \right)$ 이고,

1차반응의 유효계수, E_1 은 다음의 식과 같다.

$$E_1 = \frac{1}{m} \left(\frac{1}{\tanh(3m)} - \frac{1}{3m} \right) \quad (16)$$

식(14)~(16)을 이용하여 Michaelis-Menten형의 이론식을 Bischoff의 Generalized modulus를 적용하면 다음식으로 나타낼수 있다.

$$E_0 = \frac{E_0 + ZE_1}{1 + Z}, \quad Z = 2.6 \left(\frac{1}{\beta} \right)^{0.8} \quad (17)$$

결과 및 고찰

담체Gel내부로의 기질확산

교반되는 용액에서 Ca-alginate gel bead 내부로의 기질 분자 확산계수는 기질용액의 농도 변화를 측정하여 얻을 수 있다. 그리고 균체가 없는 gel bead의 내부구조는 균일하다고 가정하였고 *Z.mobilis*는 안정한 상태(비성장 상태)로써 균질하게 고정화시킨것으로 간주하였다. glucose의 초기농도를 5% 및 10%로 변화시켜서 기질의 용액으로부터 gel bead 내부로의 확산을 기질농도에 의해 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 순수한 물(30°C)에 있어서 glucose의 확산계수를 이용하여 식(8)로부터 계산된 농도변화를 이론치(-)로써 함께 표시하였다.

각 농도에 있어서 초기 10분 이내에 급격한 농도변화가 있었고 그 이후에서는 시간이 경과됨에따라 완만하게 변화하면서 약30분경과후 평형에 도달함으로써 더이상 기질의 확산이 이루어지지않음을 알 수 있다. 그리고 모든 실험결과치는 계산된 이론치에 잘 일치되었고 이것은 glucose가 순수한 물에서와 같이 2% Ca-alginate gel bead내부로 자유롭게 확산될 수 있음을 나타내주고 있다.

glucose 농도의 변화에 의하여 Crank식을 이용하여 균체가 없는 담체gel내부로의 기질확산계수를 구하고 또한 고정화 *Z.mobilis*에 대해 균체량을 일정하게하여 역시 기질농도의 변화에 따른 확산계수를 측정된 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 균체가 없는 bead내부로의 확산계수는 기질농도의 변화에따라 일정한 값으로써 이론치에 잘 접근

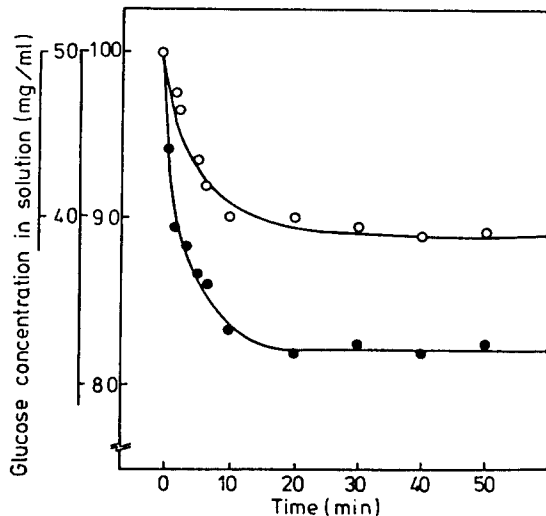


Fig. 3. Diffusion of glucose from solution into Ca-alginate gel beads: (○, ●) experimental and (—) calculated values.

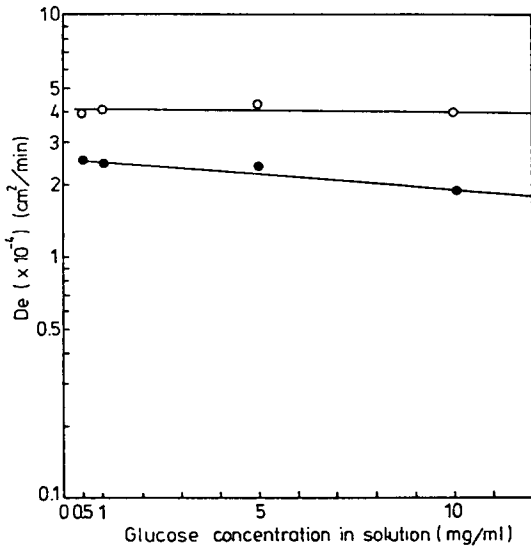


Fig. 4. Diffusion coefficients of glucose into (○) gel beads without cell and (●) immobilized *Z. mobilis* with Ca-alginate.

되고 있으나 고정화균체의 gel bead에 대한 확산계수는 초기기질의 농도증가에 따라 감소하는 경향을 볼 수 있는데 이는 확산물질의 농도증가에 의한 분자상호간의 응집력이나 또는 고정화균체에 의한 확산저항때문이라고 할 수 있다.

고정화 Zymomonas mobilis의 발효속도

배양된 *Z. mobilis*의 균을 그의 10배 체적의 배지에서 30°C로 반응하여 glucose농도와 Ethanol농도 및 균체량을 측정하여 Fig. 5에 표시하였다.

Fig. 5에 의하면 균체량증가에 따른 변화도 대수증식

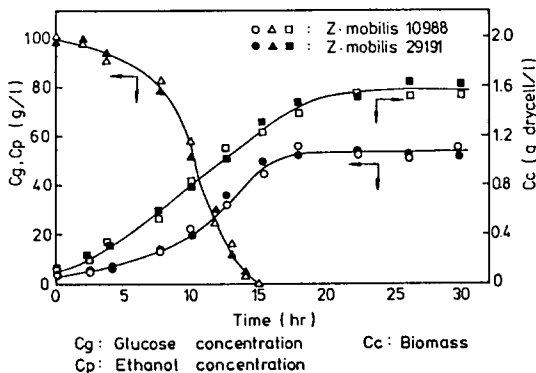


Fig. 5. Effect of 10% glucose on biomass and ethanol production for *Z. mobilis*.

에 의존되고 있으며 균체 생성량이 증가하므로써 효율적 상태에서 Ethanol이 빠른 생성물로 전화되고 있으며 고정화입자내부의 유효확산이 중요한 변수로 작용된다. 이와 같은 사실은 초기 기질의 농도 변화에 따라 속도론적 변수에 많은 영향을 주고 있음을 표현해주고 있다. 초기 pH는 5.4이었지만 약 12시간 이후에서 3.5로 감소되었고 대수증식기의 Doubling time은 약 4시간으로서 이 조건에 있어서 비증식속도(μ)는 0.173 h⁻¹이었다.

Sodium alginate 용액에 혼합된 균체를 Gel bead의 입자직경과 균체농도를 변화시켜 Free cell과 고정화 Cell에 있어서 5% 및 10% Glucose medium(기타 배지는 Table 2와 같다) 10ml에 Gel bead를 5~10개씩 넣고 교반반응을 실시하면서 시간에 따른 Glucose 농도와 Ethanol 농도를 측정하여 Fig. 6, 7에 표시하였다. 이 결과에 의하여 각각의 초기 균체농도를 이용한 Glucose의 소비속도, $-r_s$ 와 Ethanol의 생성속도, r_p 를 Table 3에 나타냈다.

Free cell의 5% Glucose농도에서는 1.5배정도로 발효속도가 높지만 10% Glucose농도에서는 오히려 낮아지고 있다. 또한 고정화균체에 있어서는 Gel bead의 입자 직경에 따른 변화보다는 초기균체농도분포의 영향이 크게 나타나고 있음을 알 수 있다. 그리고 Gel bead의 크기가 2.2mm와 3.6mm에서는 약간의 증식이 일어나고 있는 반면

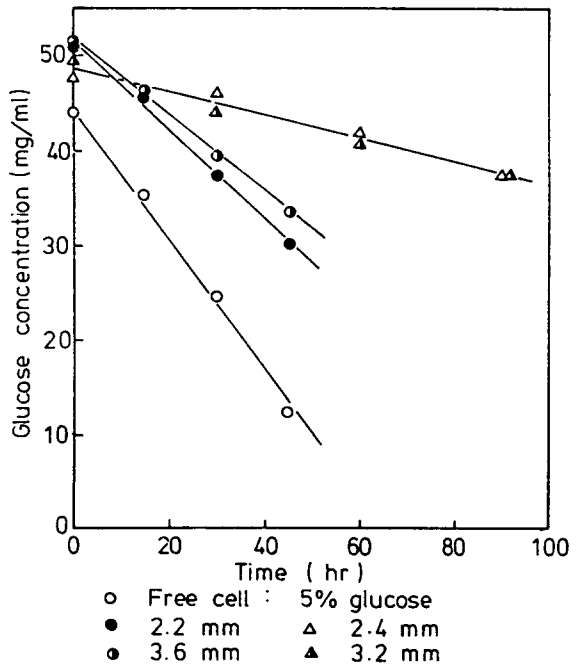


Fig. 6. Glucose concentration at various bead diameter of the immobilized *Z. mobilis* with Ca-alginate.

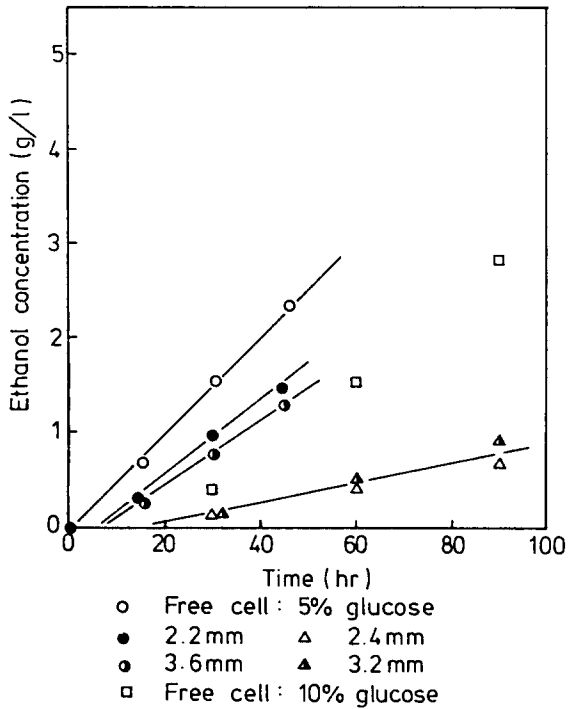


Fig. 7. Ethanol production at various bead diameter of the immobilized *Z. mobilis* with Ca-alginate.

에 2.4mm와 3.2mm의 크기를 갖는 경우의 발효속도차이는 별로 없지만 균체농도가 높음으로 담체 Gel내부에서의 기질 및 생성물의 확산저항이 일어나고 있다.

Fig. 8은 Fig. 6과 Fig. 7의 실험결과를 이론식 (11)-(13)을 이용하여 균체활성을 나타내는 반응속도를 계산하여 도시하였다.

Fig. 8에서의 기질 S는 S=1, 5, 25, 100g/l에서 생성되는 Ethanol농도, r_p 의 값이다. 그림에서 보여준바와같

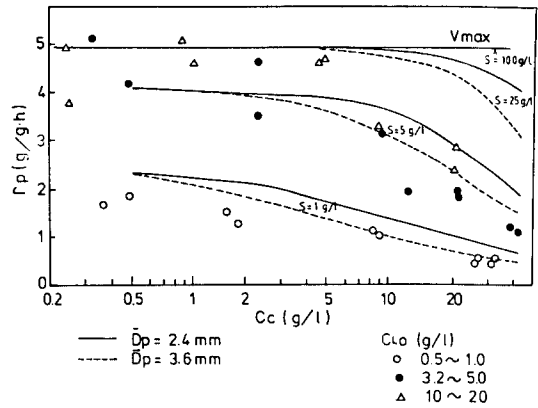


Fig. 8. Relationship between reaction rate and cell concentration.

이 반응속도와 균체량의 관계가 이론치에 잘 일치되고 있음을 확인할 수 있었다. 이 사실로써 기질의 유효확산 계수와 고정화균체량의 상관관계를 결정할 수 있음을 알 수 있었다.

담체 Gel bead의 유효확산

확산물질인 기질 Glucose와 Galactose를 Gel bead내부에 충분히 침투시키고 이것을 확산물질은 포함하지 않은 배지에 넣고 Gel내부로부터 용출되는 확산물질농도의 시간적 변화를 측정하여 \bar{C}_L / \bar{C}_{L0} 의 무차원군으로 하여 Fig. 9에 도시하였다.

Fig. 9에서 알 수 있듯이 균체 농도 변화에 의하여 비정상확산을 고려한 확산물질의 평균농도를 구할수 있다. 또한 Fig. 9에 의하여 Gel bead의 직경과 bead 내부의 균체농도 및 기질농도를 매개변수로하여 반응속도식에 의한 담체내의 물질이동의 영향을 규명하는 촉매유효계수 (E:Effectiveness Factor)를 식(11)-(17)을 이용하여 구한 결과는 0과 1사이에 존재하였다. 따라서 Michaelis-

Table 3. Fermentation rate at various bead diameter and biomass of free cell and immobilized *Z. mobilis*.

Bead diameter (mm)	Biomass (g-drycell/l-gel)	τ_s (g-glucose/g-drycell, h)	τ_p (g-EtOH/g-drycell, h)
2.2	14.2	5.6	2.2
3.6	14.2	4.6	1.9
2.4	14.7	6.5	2.8
3.2	14.7	6.5	2.8
Free cell	-	-	1.9
: 10% glucose	-	-	-
: 5% glucose	-	7.4	3.1

Menten형 반응의 이론선은 0차와 1차사이를 만족하므로 실험치의 적합함을 나타내는 것으로 사료되었다. 그리고 이 그림에 의해 구해진 유효확산계수, D_e 과 균체농도의 관계를 Fig. 10에 나타내었다. 식(10)에 의하여 Fig. 10에서 도식적방법으로 $k_1=0.65$ 와 $k_2=0.004$ l/g를 구할 수 있다. 그 결과 균체농도, $C_c=1/0.004=250$ g-dry cell/l에서 공극율 0로 될 수 있음을 알 수 있다.

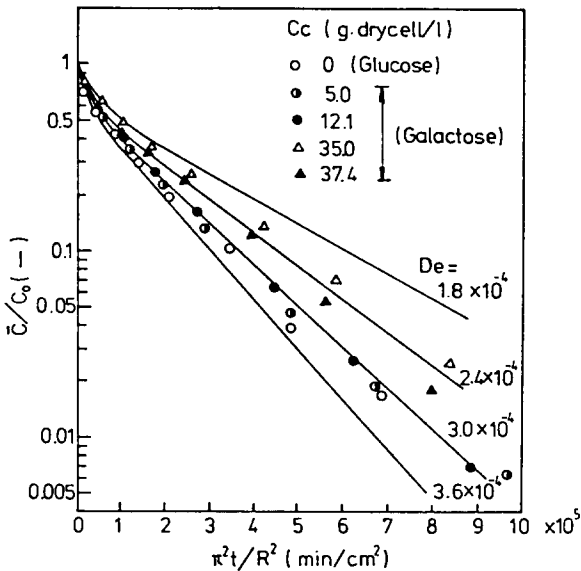


Fig. 9. Change of galactose concentration in the gel beads.

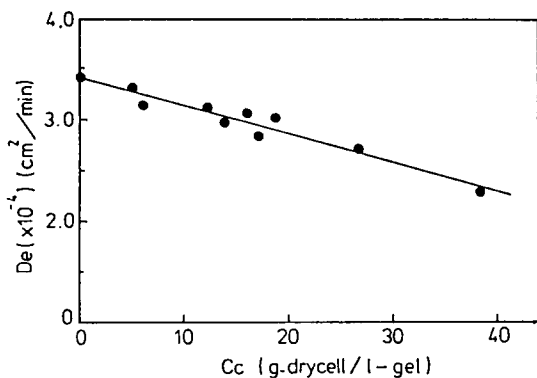


Fig. 10. Relationship between effective diffusion coefficient and cell concentration.

요 약

Ca-alginate에 의하여 포괄된 고정화 *Zymomonas mobilis*의 담체내부에 있어서 균체자체활성을 물질이동 현상으로 규명하고자 하였다. 또한 균체활성을 장기간 유지할 수 있을때 기질의 유효확산에 다른 반응속도를 고찰하여 균일상계로의 균체량농도를 결정할 수 있는 고정화 최적화를 구하고 그 활성의 변화에 대한 경향을 비교검토하였다. 반응속도와 균체량의 관계가 이론치에 잘 일치되므로써 기질의 유효확산계수, D_e 와 고정화균체량, C_c 의 상관관계를 결정할 수 있었고 이로부터 고정화 균체량 250g-dry cell/l에서 공극율 0로 될 수 있음을 알 수 있었다. 실험치의 결과는 Michaelis-Menten형반응의 0차와 1차사이를 만족하였다.

참 고 문 헌

- P.L. Rogers, K.J. Lee, and D.E. Tribe.(1980), *Process Biochem.* Aug./Sept., 7
- S.Cromie, and H.W. Doelle, (1981), *Eur. F. Appl. Microbial. Biotechnol.*, **11**,116.
- K.J. Lee, and P.L. Rogers. (1983), *Chem.Eng.f.*, **27**, 1331.
- V.K. Jain, I. Toran-Diaz, and J. Baratti.(1985), *Biotechnol. Bioeng.*,**27**,273.
- A. Margaritis, and J.B. Wallace,(1982), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*,**12**,147.
- P.K. Bajpai, J.B. Wallace, and A. Margaritis,(1985), *J. Ferment. Technol.*, **63**(2), 199.
- K.B. Bischoff.(1965), *AIChE J.*,**11**, 351.
- M. Wada., J.Kato and I. Chibata, (1980), *Eur. J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, **10**, 275.
- M. Wada, T. Uchida, J. Kato, and I. Chibata. (1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**,1175.
- H. Tanaka, M. Matsumura and I.A. Veliky(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**,53.
- K.H. Keller, E.R. Canles and S.I. Yum(1971), *J. Phys. Chem.*, **75**, 379.
- S. Furusaki, M. Seki and K. Fukumura(1983), *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 2921.
- P.L. Rogers, Kye Joon Lee and D.E. Tribe(1979), *Biotechnol. Letters.*,**1**,165.
- Furusawa and Smith(1973), *Ind. Eng. Chem. Fund.*,**12**, 360.
- P. Schneider and J.M. Smith(1986), *AIChE J.*, **14**,762.

16. Hashimoto and Smith(1973), *Ind.Eng.Chem.Fund.*, **12**, 353.
17. M. Suzuki and K. Kawazoe(1974), *J.Chem.Eng. JPN.*, **7**,346.
18. J. Crank, *Mathematics in Diffusion*(clarendon, Oxford, 1975), P. 84.
19. M. Seki and S. Furusaki(1984), *J.Chem.Eng. Japan*.
20. J. Klein and G. Manecke(1983), "*Enzyme Eng.*", vol.6,P.181, Plenum Press,
21. K.B. Bischoff(1965), *AIChE J.*, **11**,351.
22. T. Kobayashi, K. Ohmiya and S. Shianizu(1976), *J.Ferment.Technol.*, **54**, 260.

(Received June 15, 1989)