

수성이상계에서 *K. fragilis*의 에탄올 추출발효 특성에 관한 연구

김진한 · *허병기 · **목영일

인천전문대학 환경공업과

*인하대학교 공과대학 생물공학과

**아주대학교 공과대학 화학공학과

Extractive Ethanol Fermentation Characteristics of *K. fragilis* in an Aqueous Two Phase System

Jin-Han Kim, *Byung Ki Hur and **Young Il Mok

Department of Environmental Technology, Junior College of Incheon, Incheon 402-750, Korea

*Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

**Department of Chemical Engineering, Ajou University, Suwon 441-749, Korea

ABSTRACT

Fermentation characteristics of *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555 with Jerusalem artichoke juice, in extractive ethanol fermentation in aqueous two phase systems composed of polyethylene glycol 20000 (PEG) and crude dextran(Dx), were investigated as a function of initial sugar concentrations, concentrations of ethanol formed, or fermentation time. Both specific ethanol production rate increased with decrease in concentrations of PEG and Dx in two-phase systems. Without being related to the compositions of aqueous two-phase system, maximum specific cell growth rate and maximum specific ethanol production rate were showed in the initial sugar concentration fo 80g/l and 120g/l, respectively. The inhibition effects of ethanol on specific cell growth rate and specific ethanol production rate decreased with decrease in PEG concentration and in the range of 2.5 to 5% Dx. Specific cell growth rate and specific ethanol production rate was fitted as an exponential function and a hyperbolic function, respectively, of the concentrations of ethanol formed. Overall ethanol productivity increased with increase in initial sugar concentrations, and also the required time for the maximum productivity was so. Ethanol production rate by the elapsed fermentation time showed the maximum value in the initial sugar concentration of 160g/l.

서론

에탄올은 대기오염 제어를 위한 청정연료로서, 그리고 고갈성인 석유자원을 대체할 수 있는 화학공업 원료자원으로서 활용 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(1, 2). 전형적인 에탄올 생산 공정에서는 생성

된 에탄올에 의한 저해영향으로 인하여 생산성이 제한되고, 또한 낮은 농도의 기질 용액을 사용하게 됨으로써 분리비용이 상승하는 결과가 초래된다. 이와 같은 에탄올 생산 공정의 한계를 극복하기 위한 방법으로서 고정화 효모나 균체 재순환 시스템을 응용한 고농도 균체에 의한 발효시스템 및 에탄올 생산

과 동시에 연속적으로 제거하는 추출발효시스템이 제안되었다. 여러 가지 발효공정에 대한 경제성을 비교한 연구(3)에 의하면 유기용매를 이용한 추출발효공정은 아직 완성단계에 있지는 않으나 알코올 생산비가 가장 낮은 것으로 보고되었다. 에탄올의 추출분리에 유리한 용매는 균체에 대한 독성이 크고 발효에 적합한 유기용매는 분배계수가 낮은 것으로 알려져 있다(4, 5). 수성이상계는 균체에 유리한 환경을 제공하고 추출발효에도 적합한 것으로 알려져 있다(6, 7). 수성이상계를 이용한 에탄올 발효공정은 요구되는 용수량이 작아 폐수처리 비용을 감소시킬 수 있고, 균체수율이 제한되므로 에탄올 수율이 향상되고 또한 균체가 발효조 내에 잔류하므로 균체 재순환 연속발효에 매우 적합한 것으로 보고되었다(8). 수성이상계를 응용한 에탄올 발효의 연구들은 주로 수성이상계의 응용성과 공정의 집적화 가능성을 제시한 것들이며 수성이상계 구성물질의 영향이나 수성이상계에서의 반응특성을 기질농도 및 생성물 농도의 함수로 체계화한 연구는 미흡한 실정이다. Polyethylene glycol(PEG)과 Dextran(Dx)으로 구성된 수성이상계에서 에탄올 분배계수는 25% PEG/6% Dx 조성일 때 1.9로서 높은 값을 가지지만 PEG 농도가 높은 수성이상계는 에탄올 발효에 유리하지 않은 것으로 보고되었다(9). 본 연구에서는 문헌(9)의 결과를 기초로 하고, 공정의 경제성과 관련하여 비교적 낮은 농도범위에서 형성되는 수성이상계를 사용하여 *K. fragilis*에 의한 돼지감자 주스의 에탄올 발효에 대한 발효특성치를 초기 당농도 및 생산 알코올 농도의 함수로 규명함으로써 수성이상계 에탄올 추출발효공정에 대한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 돼지감자 탄수화물의 주성분인 이눌린을 직접 에탄올로 발효할 수 있고 에탄올 수율, 발효속도 등이 높은 것으로 알려진 *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555(10, 11)이며 YM agar 배지에서 35°C, 24시간 배양하여 4°C에서 보관하면서 실험시에 접종용 균체의 배양에 이용하였다.

발효기질

발효실험에 이용한 기질은 문헌의 방법(11)을 이용

하여 처리한 돼지감자 주스이며 총당 농도는 120g/ℓ 이었다. 실험은 PEG 농도를 8, 6.5, 5, 3.5, 2%(w/v)로 하고, Dx 농도를 7, 5.5, 4, 2.5, 1%(w/v)로 하여 이루어진 13개 조성의 PEG 20,000/Dx 이상계에서 수행하였다. 또한 임계점 근방의 조성을 가진 단일상계와 PEG와 Dx을 첨가하지 않고 돼지감자 주스만을 사용한 대조실험을 동시에 실시하였다. 각 실험 batch의 이상계 발효기질용액의 부피는 모두 250ml로 하였다. 각 batch의 이상계 발효기질용액의 조제는 Kim 등의 방법(9)으로 당용액과 물의 첨가량을 달리하여 초기 당농도가 40, 80, 120, 160, 200g/ℓ 이 되도록 하였다.

발효실험 및 시료의 분석

YM 배지에서 35°C, 20시간 진탕배양하고 4시간 침강시켜 얻은 농축균체를 접종용으로 이용하였다. 500ml 삼각플라스크 내의 이상계 기질용액에 농축균체를 2.0ml씩 접종하였으며 균체의 초기농도는 0.5g/ℓ 이었다. 발효실험은 회전식 진탕배양기에서 온도 35°C, 회전수 150rpm로 진탕배양하였으며 발효시작 후 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28시간에 실험용액을 혼합하면서 주사기로 12ml씩 시료를 채취하였다. 채취한 시료를 잘 혼합하여 다시 1ml을 분취하여 균체농도 및 전체상의 에탄올 농도의 측정에서 이용하였다. 나머지 시료는 눈금이 있는 15ml 원심시험관에 넣고 끓는 물중에서 1분간 중탕하고 급냉혼합시킨 후 다시 35°C의 항온수조에서 30분간 방치하여 윗상과 아랫상의 부피비 및 에탄올 농도 측정에서 이용하였다. 균체농도는 Hemacytometer slide를 이용하여 균체수를 측정하고 균체수와 건조중량사이의 상관관계로부터 구하였다. 균체의 건조중량측정에서 수성이상계 시료를 50°C의 0.9% NaCl 용액으로 8회, 증류수로 2회 세척하고 세척시마다 5,000rpm에서 30분간 원심분리하였으며 이것을 105°C 건조기 안에서 24시간 건조시킨 후 데시케이터 안에서 30분간 실온으로 냉각하여 균체의 건조중량을 측정하였다. 데시케이터의 건조제로는 P₂O₅를 사용하였다. 윗상과 아랫상, 전체상의 에탄올농도 측정은 n-propanol을 내표준 물질로 하여 가스크로마토그래피(HP 5890A)로 분석하였다. 에탄올 측정용 시료는 분리 후 각 상에 대하여 분석용 저울로 0.500g을 평량하고 여기에 2g n-propanol/ℓ 용액 10ml를 넣어 조제하였다. 아랫상의 에탄올 농도측정시 아랫상에 분배된 균체량은 무시하였다.

결과 및 고찰

비증식속도와 에탄올 비생성속도

균체의 비증식속도(specific growth rate, μ hr⁻¹)와 에탄올 비생성속도(specific ethanol production rate, ν g/g · hr)는 균체농도와 에탄올 농도를 각각 발효시간, t에 대하여 회귀분석하여 얻은 n차 다항식 및 그의 미분식을 이용하여 계산하였다. 회귀분석으로 얻어진 다항식의 차수는 6~8 차이였고 결정계수, R²는 0.99 이상이었다.

Fig. 1는 여러 가지 조성의 발효계에 대하여 대수 증식기에서 *K. Fragilis*의 비증식속도(μ)를 초기 당농도의 함수로 표현한 것이다. μ 는 본 연구의 모든 발효계에 대하여 초기 당농도 80g/l 일 때 최대치를 보였으며 이상계의 μ 는 3.5% PEG/1% Dx 이상계의 0.344hr⁻¹와 8% PEG/7% Dx 이상계의 0.327hr⁻¹ 사이의 값을 나타냈다. 또한 돼지감자 주스만을 사용한 대조실험계의 μ 는 0.347hr⁻¹이었고, 40~80g/l의 당농도 범위에서 이상계 및 2% PEG/1% Dx로 조제된 단일상계의 μ 보다 약간 큰 값을 보였다. 초기 당농도가 80g/l를 초과하면 대조실험계의 μ 는 급격히 감소하고, 120g/l에서는 단일상계 및 8% PEG/7% Dx인 이상계의 μ 와 서로 비슷하지만 그 이외의 이상계에서의 μ 보다 작아진다. 당농도 120g/l 이상에서 본 연구의 모든 이상계의 μ 는 대조실험계의 μ 보다 큰 값이었다. 이것은 초기 당농도가 105g/l 이상이면 기질 저해작용에 기인하여 비증식속도가 감소하기 때문이며(11) 또한 이상계 추출발효에서는 기질의 분배에 따른 저해영향이 다소 감소되기 때문인 것으로 생각된다. 한편 이상계에서의 μ 는 PEG 및 Dx 농도가 낮을수록 증가하였다. 이것은 이상계에서 PEG와 Dx의 첨가에 따른 점도의 증가로 인하여 산소 전달저항이 대조실험계보다 커지게 되며, 그에 따라 대조실험계는 다른 발효계보다 호기성 환경으로 되고 균체의 성장이 다소 촉진되기 때문인 것으로 생각된다. 또한 이상계의 조성에 따른 μ 의 차이도 이와 유사한 것으로 생각된다.

에탄올 비생성속도(ν)를 여러 가지 조성의 발효계에 대하여 초기 당농도의 함수로 나타내면 Fig. 2와 같다. 본 연구의 이상계는 모두 초기 당농도 120g/l에서 ν 가 최대치를 보였으며 3.5% PEG/2.5% Dx 이상계의 2.05hr⁻¹와 8% PEG/7% Dx 이상계의 1.91hr⁻¹ 사이의 값을 나타냈으며, PEG 농도 및 Dx 농도가 낮을수록 큰값을 보였다. 또한 단일상계

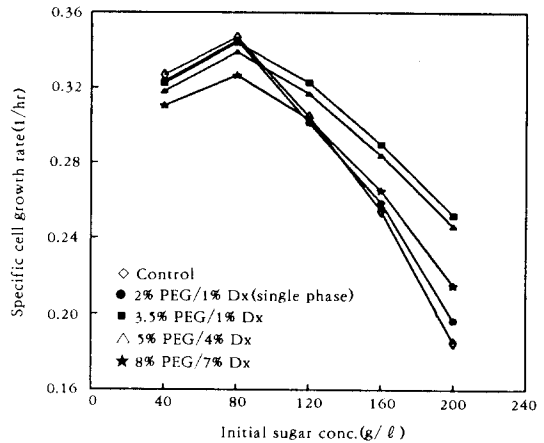


Fig. 1. Specific cell growth rate as a function of the initial sugar concentration on the various composition of an aqueous two phase system.

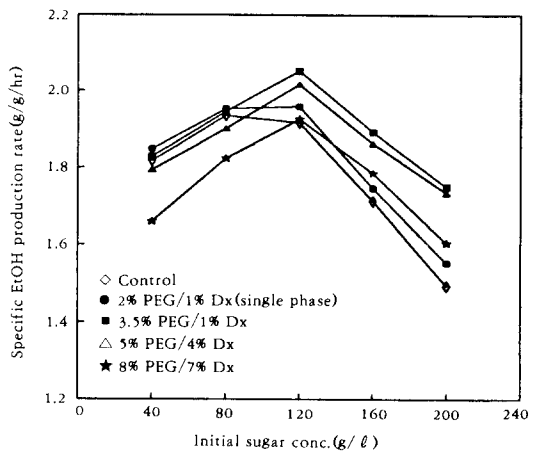


Fig. 2. Specific ethanol production rate as a function of the initial sugar concentration on the various composition of an aqueous two phase system.

에서는 초기 당농도 80~120g/l의 범위에서 서로 유사한 ν 를 나타냈다. 반면에 대조실험계에서의 ν 는 초기 당농도 80g/l 일 때 최대치(1.92hr⁻¹)를 보이고 120g/l까지는 거의 비슷한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 그리고 본 연구의 모든 발효계는 초기 당농도가 120g/l 이상이 되면 에탄올 생합성 저해(11, 14)가 일어나기 때문으로 보인다. *Kluyve-*

Table 1. Model fitting results for nonlinear regression analysis.

System %PEG/%Dx		$\mu = \mu_m \cdot \exp(-K_m P)$		$\nu = \nu_m \cdot K_p / (K_p + P)$	
		μ_m	K_m	ν_m	K_p
8	1	0.3576	0.050157	2.3333	17.04919
8	4	0.3523	0.050182	2.3142	17.44348
8	7	0.3452	0.050434	2.2259	17.28281
6.5	2.5	0.3608	0.048315	2.3710	17.73636
6.5	5.5	0.3560	0.047888	2.3591	17.77388
5	1	0.3652	0.047909	2.3975	18.02144
5	4	0.3650	0.047036	2.3869	18.17064
5	7	0.3511	0.047868	2.2813	18.10897
3.5	1	0.3727	0.046972	2.4241	18.42873
3.5	2.5	0.3694	0.045624	2.4207	18.97536
3.5	5.5	0.3587	0.044536	2.4226	18.68743
2	4	0.3627	0.042854	2.4425	19.49569
2	7	0.3531	0.043989	2.2710	20.57055
2	1	0.3562	0.046910	2.4595	16.03071
Control		0.3625	0.050920	2.4952	12.78888

romyces sp.는 돼지감자 주스의 회분식 발효에서 초기 당농도 100~125g/l에서 ν 의 최대치를 보이며 (11, 15), 단순 CSTR에서는 당농도가 110g/l 일 때 ν 가 2.2~2.55g/g·hr로서 최대치를 나타내는 것으로 보고되었다(16).

에탄올 저해 특성

수성이상계 추출발효에서 에탄올에 의한 저해 특성을 규명하기 위하여 균체의 비증식속도와 에탄올 비생성속도를 해당 발효시간에서의 아랫상의 에탄올 농도의 함수로서 비선형 회귀분석을 하였다. 회귀분석에서 비증식속도, 비생성속도 및 아랫상 에탄올농도는 40~200g/l의 당농도에 대하여 n차 다항회귀식에 의하여 얻어진 계산치들 중 최대 비증식속도 및 최대 비생성속도가 나타난 발효시간 이후의 값들을 사용하였다. 에탄올 저해영향에 대한 함수관계는 linear, exponential, hyperbolic, parabolic형 등 4가지 함수식을 적용하였다(17~20). 이들에 대한 회귀분석 결과에 의하면 균체의 비증식속도 및 에탄올 비생성속도에 대한 저해모델은 각각 지수함수형과 쌍곡선(hyperbolic) 함수형이 본 연구의 실험결과에 비교적 잘 적합되었으며 그 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 K_m , K_p 는 각각 균체의 비증식속도와 에탄올 비생성속도에 대한 저해상수이며 결정계수, R^2 는 0.93~0.97이었다.

Fig. 3에 균체의 비증식속도에 대한 에탄올 저해

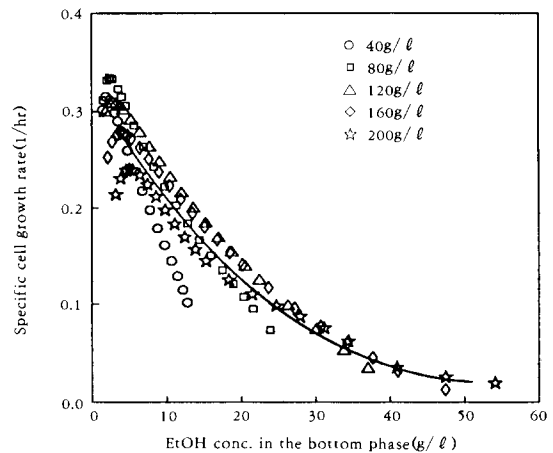


Fig. 3. Specific cell growth rate as a function of the ethanol concentration formed during fermentation with the various initial sugar concentration in the 8%(w/v) PEG/1%(w/v) Dx two phase system.

영향을 도시하였으며 Fig. 3의 곡선은 지수함수식에 의한 계산치를 나타낸 것으로서 Vega 등(17)이 보고한 바와 일치하는 것이다. 문헌에 보고된 균체 증식속도에 대한 에탄올 저해상수, K_m 는 0.025~0.1290 l/g(17), 0.046 l/g(21) 등이다. Fig. 4는

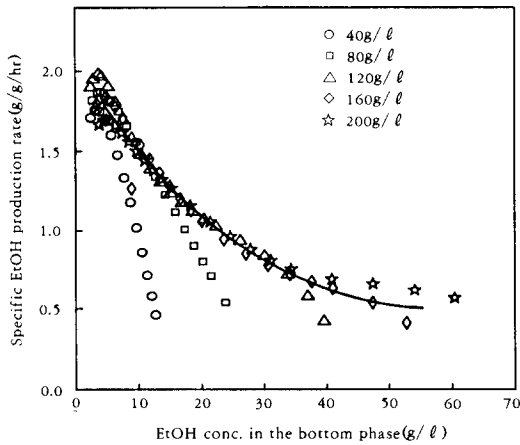


Fig. 4. Specific ethanol production rate as a function of the ethanol concentration formed during fermentation with the various initial sugar concentration in the 8%(w/v) PEG/1%(w/v) Dx two phase system.

에탄올 비생성속도에 대한 에탄올 저해 영향을 도시한 것이며 Fig. 4의 곡선은 쌍곡선함수식에 의한 계산치를 나타낸 것이다. 문헌에 보고된 에탄올 비생성속도에 대한 에탄올 저해상수는 지수함수형인 경우 K_p 는 0.021 l/g(21), 0.0926 l/g(17), 0.0567 l/g(17) 등이며, 쌍곡선 함수형인 경우 K_p 는 20.5 l/g(18)이었다. 본 연구의 에탄올 저해상수는 문헌에 보고된 값들과 유사하였으나 수성이상계 추출발효는 전반적으로 대조실험에 비하여 에탄올 비생성속도에 대한 저해 영향이 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 PEG/Dx 수성이상계에서 에탄올 분배계수가 1.2 이상(23)으로써 균체 주위의 에탄올 농도가 다소 감소하기 때문인 것으로 보인다. 수성이상계 조성에 따른 저해상수를 살펴 보면 PEG 농도가 낮고 또한 Dx 농도가 2.5~5% 범위에서 에탄올 저해 영향이 작은 것으로 나타났다.

에탄올 생산성

에탄올의 부피생산성(volumetric ethanol productivity, Q g/l · hr)은 식(1)과 식(2)에 의하여 계산하였다.

$$Q_{Pmax} = (P_{max} - P_0) / t_{Pmax} \quad (1)$$

$$Q_t = (P_t - P_0) / t \quad (2)$$

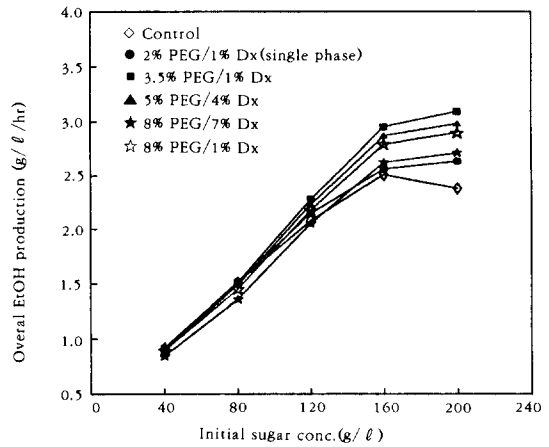


Fig. 5. Overall ethanol productivity as a function of the initial sugar concentration on the various composition of an aqueous two phase system.

여기에서 P_t , P_0 는 각각 발효시간 $t=t$ 및 $t=0$ 에서의 에탄올 농도이고, Q_{Pmax} 는 발효기간 중 최대 에탄올 농도(P_{max})에 도달하는 시간, T_{Pmax} 에서 총괄 에탄올생산성이며, Q_t 는 발효시간 t 에서 에탄올 생산속도를 의미한다.

발효기간 중 전체상의 에탄올농도가 최대인 시간까지의 전체상의 총괄 에탄올 생산성(Q_{Pmax})을 여러 가지 발효계에 대하여 초기 당농도의 함수로 나타내면 Fig. 5와 같다. Q_{Pmax} 는 초기 당농도 160g/l까지는 급속히 증가하지만 그 이상의 당농도에서는 매우 완만하게 증가하였다. 당농도 40g/l에서의 Q_{Pmax} 와 160g/l에서의 Q_{Pmax} 를 비교하여 보면 이상계의 Q_{Pmax} 는 3배 정도 증가하였으나 대조실험계는 2.5배 증가하였다. 대조실험계의 Q_{Pmax} 는 초기 당농도 120g/l까지는 이상계의 Q_{Pmax} 와 유사한 값을 보였으나 그 이상이 되면 이상계의 Q_{Pmax} 보다 작아지는 경향을 보였다. 초기 당농도 80g/l 미만에서는 대조실험계의 생산성과 수성이상계 추출발효계의 생산성 사이에는 차이가 거의 없었으나 당농도가 높아질수록 생산성의 차이는 증가하였다. 이러한 경향성은 뒷상에서의 에탄올 생산성에 대하여도 유사한 것으로 나타났다. 초기 당농도 160g/l와 200g/l 일 때 3.5% PEG/2.5% Dx 이상계의 Q_{Pmax} 는 전체상에서 각각 2.96g/l · hr와 3.10g/l · hr이었고 뒷상에서는 각각 3.08g/l · hr와 3.21g/l · hr인 반면에 대

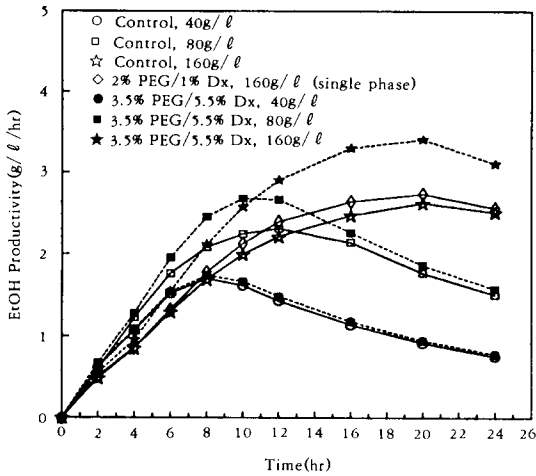


Fig. 6. Ethanol productivity as a function of time on the various composition of fermentation system.

조실험계의 Q_{Pmax} 는 각각 $2.51g/l \cdot hr$ 와 $2.38g/l \cdot hr$ 이었다. 수성이상계 추출발효를 통하여 대조실험계에 비하여 1.2배 이상의 총괄에탄올 생산성을 증가시킬 수 있었으며, 초기 당농도가 높아질수록 수성이상계 추출발효가 더욱 유리하다는 것을 알 수 있었다.

Fig. 6은 초기 당농도를 매개변수로 하고 발효시간, t 에서의 에탄올 생산속도를 발효시간의 함수로서 나타낸 것이다. 초기 당농도 $40g/l$ 에서는 이상계의 생산속도와 대조실험계의 생산속도 사이에는 차이가 거의 없었으며 발효시간 8hr에서 최대치에 도달하였다. 초기 당농도가 증가함에 따라 생산속도가 최대치에 도달하는 소요시간이 길어지며 당농도 $160g/l$ 에서는 소요시간이 20hr로서 당농도 $40g/l$ 인 경우에 비하여 2배 이상 증가하였다. 또한 초기 당농도 증가에 따라 에탄올 생산속도는 대조실험계에 비하여 수성이상계 발효에서 높은 값을 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 대조실험계에 비하여 PEG와 Dx를 함유하는 단일상계 및 이상계에서의 생산성이 높게 나타나는 것은 Hägerdal 등의 결과(22)와 유사하다. Hägerdal 등(22)은 PEG와 Dx의 첨가에 의하여 초기 에탄올 생성속도가 50% 증가하고 에탄올 수율이 5% 증가된다는 연구 결과를 발표하였다. 또한 이것은 PEG와 Dx의 첨가에 의한 물의 활동도 감소에 기인된 것이라고 하였다.

요 약

여러 가지 조성의 PEG 20000/Dx로 구성된 수성이상계를 사용한 에탄올 추출발효실험을 통하여 *K. fragilis*에 의한 돼지감자 주스의 발효 특성을 초기 당농도 및 생성 알코올 농도의 함수로 규명하여 다음의 결과를 얻었다. 균체의 비증식속도 및 에탄올 비생성속도는 PEG 및 Dx 농도가 낮을수록 증가하였다. 비증식속도는 조성에 무관하게 초기 당농도 $80g/l$ 에서 최대치를 보였고, 에탄올 비생성속도는 $120g/l$ 에서 최대치를 보였다. 생성 알코올 농도에 의한 저해 영향은 비증식속도에 대하여 지수함수형을, 에탄올 비생성속도에 대하여 쌍곡선함수형을 나타냈다. Dx 농도가 2.5~5% 범위에서 PEG 농도가 낮을수록 에탄올 저해 영향은 감소하였다. 총괄 에탄올 생산성은 초기 당농도가 증가할수록 높았으며 생산성이 최대치에 도달하는 소요시간도 당농도가 증가함에 따라 증가하였다. 시간별 에탄올 생산속도는 초기 당농도 $160g/l$ 에서 가장 높은 값을 보였다. 총괄 에탄올 생산성은 대조실험에 비하여 수성이상계 추출발효를 통하여 1.2배 이상 증가하였고 초기 당농도가 높을수록 이상계 추출발효가 더욱 유리한 것으로 나타났다.

참고 문헌

1. J. L. Keller(1979), *Hydrocarbon Process.*, **58** (5), 127.
2. K. A. Kovoly(1982), *Chem. Tech.*, **12**(8), 486.
3. B. L. Maiorella, H. W. Blanch and C. R. Wilke(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1003.
4. F. Kollerup and A. J. Daugulis(1985), *Can. J. Chem. Eng.*, **63**, 919.
5. F. Kollerup and A. J. Daugulis(1986), *Can. J. Chem. Eng.*, **64**, 598.
6. H. Walter, D. E. Brooks and D. Fisher(1985), *Partitioning in Aqueous Two Phase Systems*, Academic Press, New York.
7. B. Mattiasson and O. Holst(1991), *Extractive Bioconversion*, Bioprocess Technology(W. C. McGregor ed.), Vol. 11, Marcel Dekker, Inc., NY.
8. I. Kuhn(1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2393.
9. J. H. Kim, B. K. Hur and Y. I. Mok(1991), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **6**, 175.

10. S. K. Layokun, I. A. Fatile, B. O. Solomon and G. N. Agho(1985), *Process Biochem.*, **20** (6), 92.
11. B. K. Hur, J. S. Yu and J. W. Yang(1989), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 50.
12. N. Chabbert, Ph. Braun, J. P. Guiraud, M. Arnoux and P. Galzy(1985), *Biomass*, **3**, 209.
13. N. Chabbert. J. P. Guiraud, M. Arnoux and P. Galzy(1985), *Biomass*, **6**, 271.
14. N. Kosaric, A. Wiczrek, G. P. Cosentino and Z. Duvnjac(1985), *Adv. Biochem. Eng.*, **32**, 1.
15. Z. Duvnjac, N. Kosaric and D. Hayes(1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 589.
16. A. Margariti and P. Bajpai(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1483.
17. J. L. Vega, A. R. Navarro, E. C. Clausen and J. L. Gaddy(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 633.
18. A. J. Daugulis D. E. Swaine(1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 639.
19. A. Moser(1985), *Biotechnology*, Vol. 2(H. Brauer ed.), Velag Chemie, Weinheim, p. 589.
20. M. Novak, P. Strehaiana, M. Moreno and G. Goma(1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 201.
21. T. Chattaway, G. Goma and P.-Y. Renaud (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 271.
22. B. Hahn. Hägerdal, M. Larsson and B. Mattiasson(1982), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **12**, 199.
23. B. Mattiasson(1983), *Trends Biotechnol.*, **1**, 16.