مجله مهندسی انرژی و محیط زیست، سال ۱، شماره ۱، پائیز ۱۳۸۸، صفحه ۱۵- ۹

تثبیت سلول‌های P. acidi-propeonici در بیوراکتورهای لوله‌ای و مطالعه مدل سینتیکی آن

مائده السادات محمدی[۱]، مصطفی رحیم نژاد[۱]، قاسم نجف پور[۲]*

۱- دانشجوی دکتری دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، mohammadi_fanni@yahoo.com
۲- استاد دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه صنعتی بابل،

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۲۴

چکیده

برای تثبیت سلول‌های آزاد میکروبی در بیوراکتورهای لوله‌ای از پلیمرهایی استفاده می‌شود که شبکه سلولی را با اتصال دیواره یک سلول به سلول دیگر ایجاد می‌نماید تا از دانسیته سلولی بالاتری برخوردار شود. غلظت سلول‌های مشبک بیش از غلظت سلول‌ها در حالت آزاد است. در این مقاله برای تعیین عملکرد و مدل نمودن پارامترهای راکتور ICR از P. acidi-propeonici تثبیت شده در راکتور لوله‌ای با جریان محوری، استفاده شد و بازدهی ICR با اندازه گیری مصرف گلوکز و زایلوز در غلظت‌ها و زمان ماندهای (۵/۸، ۱۲، ۲۰ و ۲۸ ساعت) و تولید پروپیونیک و استیک اسید در طول راکتور محاسبه گردید. سینتیک درجه اول برای این نوع راکتور با مواد خاص بالا اثبات گردید و ثوابت سرعت ۰/۷۹، ۰/۶۹، ۰/۶۸، ۰/۶۸ و۰/۵۱ (h^{-1}) به ترتیب در شدت جریان‌های ۲۱۴، ۱۳۵، ۹۰، ۵۵ و ۳۸ میلی لیتر بر ساعت به دست آمده است.

واژه‌های کلیدی: *بیوراکتور، تثبیت سلول‌ها، شبکه سلولی، مدل سینتیکی*

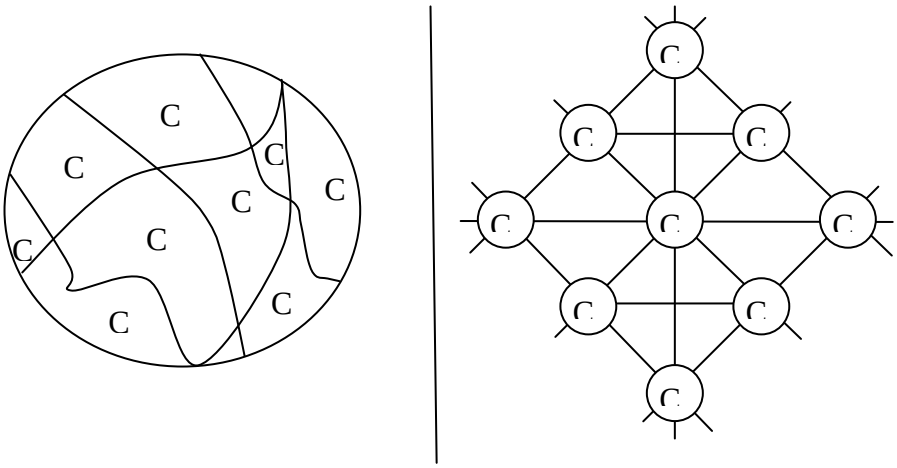
مقدمه

از دیر باز متخصصین و بیوتکنولوژیست‌ها از کاهش فعالیت آنزیم‌ها و روند نزولی ضریب تبدیل و فعالیت بیو کاتالیستی سلول‌ها آگاهی داشته و برای حل این مشگل به تثبیت آنزیم و سلول‌ها دست زده اند [۱-۵] . امری واضح است که آنزیم‌ها زمانی که تثبیت می‌شوند، در رفتارشان تغییراتی حاصل می‌شود. در دو دهه گذشته تثبیت میکروارگانیزم‌ها، سلول‌ها و اجزای سلولی به تدریج در جایگاه ویژه و کاربردی میکروبیولوژی صنعتی و بیوتکنولوژی را به خود اختصاص داده‌اند [۶]. روش‌های ثابت سازی سلولی، روش‌های بهینه‌ای هستند که برای آنزیم‌ها به کار می‌روند اما میکروب‌های با اندازه بزرگ‌تر بر این روش‌ها تأثیر می‌گذارند. برای پایداری و تثبیت آنزیم‌ها دو روش پیشرفته موجود است که برای میکروارگانیزم‌ها به کار رفته است. برای تثبیت و پایداری تک سلول از به هم متصل نمودن دیواره سلول‌ها در شبکه‌ای توری مانند و یا محبوس کردن ارگانیزم‌ها در یک فضای محدود استفاده می‌گردد [۸ و۷]. در شبکه‌های توری مانند سلول‌های میکروبی به صورت مستقیم در درون شبکه پلیمری به دام می‌افتند. این روش برای میکروارگانیزم‌های ژلاتین، آگار، ژل پلی آکریلید آمید، آلژینات کلسیم و... به عنوان عامل به دام اندازنده مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش سلول‌های میکروبی ظاهرا به وسلیه عامل به دام اندازنده لیزین می‌گردند ولی فعالیت آنزیمی مطلوب خود را حفظ می‌نمایند. از مزایای این روش نشت سلولی می‌باشد که

*- نویسنده مکاتبه کننده
Email : najafpour@yahoo.com

ممکن است به عنوان حمل کننده نفوذی عمل نماید و سبب سختی در انتقال سوبسترا و محصول از شبکه سلولی گردد.

همچنین می‌توان میکروارگانیسم‌ها را با پیوندهای کووالانسی تثبیت نمود. با استفاده از این روش‌ها میکروارگانیزم‌ها با مواد پلی ساکاریدی به یکدیگر متصل می‌شوند به عبارت دیگر از موادشیمیایی برای ایجاد شبکه برای محبوس نمودن سلول‌ها استفاده می‌گردد. این سطوح (خصوصاً پروتئین‌ها) میکروارگانیزم‌ها و گروه‌های آلدهید مواد چسبنده به سطح میکروارگانیزم‌ها را به یکدیگر پیوند می‌دهند. در جدول شماره ۲ تعدادی از این میکروارگانیزم‌ها به همراه محصولات تولید شونده آنها آورده شده است. به عنوان مثال مخمرها با گروه‌های ε- آمین آزاد یا گروه‌های آمین N- ترمینال برای شکل دهی ثانویه و ایجاد آمین‌ها واکنش می‌دهند. برای ترکیبات دیگر گروه آمین‌ها برای دو برابر کردن اتصال اولیگومرهای α و β واکنش دیگری پیشنهاد شده است که در ترکیبات مایع گلوتارالدهید متداول می‌باشد. با دانستن مکانیزم تثبیت سلول‌ها می‌توان به چگونگی پیوند شیمیایی آنها نیز پی برد. این پیوندهای شیمیایی تأثیرات عوامل بازدارنده و سمّی بر روی میکروارگانیزم‌ها که در حالت عادی بسیار شدید می‌باشد را کاهش می‌دهد. این واکنش‌ها نسبتاً قابل درک می‌باشند و می‌توانند باعث کاهش نرخ ازدست رفتن میکروارگانیزم‌ها گردند [۹ و۱۰]. جدول ۱ روش‌های تثبیت سلولی بر پایه پلیمری و شکل ۱ روش‌های متداول تثبیت سلولی به صورت شبکه سلولی و توده کروی سلولی با استفاده از ماتریکس پلیمری را نشان می‌دهند.



شکل ۱- روش‌های متداول تثبیت سلولی [۱]

الف: روش شبکه سلولی در تثبیت ، ب: توده کروی سلولی با استفاده از ماتریکس پلیمری آلژینات

جدول ۱- روش‌های تثبیت سلولی [۲]

تثبیت سلولی	
بدون نگه دارنده با نگه دارنده	• توده سلولی به صورت توده ای با اتصال عرضی و پیوند کووالانسی • جذب سطحی با استفاده از تبادل یونی یا یون‌های غیر آلی • تشکیل بیوفیلم
به دام انداختن سلول‌ها	
	• پلیمرهای آلی • پلیمرهای غیرآلی • پلیمرهای نیمه تراوا

جدول ۲- سلول‌های میکروبی که به صورت کووالانسی به پایه‌های متنوع شبکه ساخته‌اند[۲]

نوع میکروارگانیزم	نگه دارنده	محصول
Actobacter	هیدروکسیدهای فلزی	*اسید استیک*
Aspergillus niger	گلیسیدیل متاکریلیت	*اسید گلونیک*
Micrococcus	CM-سلولز	*اسید یوراکانیک*
Saccharomyces cerevisiae	سیلیکای آمینو پروپیل	*اتانول*
Saccharomyces cerevisiae	الکیل هیدروکسی متاکریلیت	*مواد کشنده سمی*
Saccharomyces cerevisiae	سلولز	*اتانول*
Zygosaccharomyces lactis	*الکیل هیدروکسی متاکریلیت*	*β-گالاکتوسیتاز*

سیستم سلول‌های تثبیت شده نسبت به سیستم ناپیوسته یا *CSTR* مزایایی دارد. اولین و مهم‌ترین مزیت آن قابلیت بازیابی یا استفاده مجدد از میکروارگانیسم است زیرا تا انتهای فرایند همراه با محصولات در راکتور حفظ می‌شوند. دوم این که عمل تثبیت را می‌توان برای یک فرایند پیوسته با حفظ دانسیته سلولی بالا به کار برد که در نتیجه موجب بازدهی بالا می‌شود. سومین مزیت این سیستم‌ها این است که کاهش مواد مغذی و هرگونه ترکیب بازدارنده عموما تاثیر زیادی روی سلول‌های تثبیت شده نمی‌گذارد زیرا سلول‌ها با عمل تثبیت محکم و ثابت شده‌اند. در سیستم‌های نا پیوسته یا *CSTR* مشکلات عمده مربوط به کاهش مواد مغذی، بازدارندگی و تجمع محصولات جانبی سمی است اما سلول‌های تثبیت شده معمولا تحت تاثیر محصولات جانبی سمی‌ای که در راکتور تجمع یافته اند، قرار نمی‌گیرند [۲و۱۱].

۲- مواد و روش تحقیق

برای تعیین عملکرد و مدل نمودن پارامترهای راکتور ICR[1] از *P. acidi-propeonici* تثبیت شده در یک راکتور لوله‌ای با جریان محوری، آزمایش‌هایی انجام شد. بازدهی ICR با اندازه‌گیری مصرف گلوکز و زایلوز و تولید پروپیونیک و استیک اسید در طول راکتور محاسبه گردید.

برای آماده سازی آکنه‌ها از این روش استفاده گردید که ابتدا ستون را از حلقه‌های راشینگ[2] تمیز پر نموده و محلول داغ ژلاتین آگار از ستون عبور داده شد تا تمام سطوح آکنه‌ها را مرطوب نماید. زمانی که روکش خشک شد، محلول گلاتارآلدهید با روش مشابهی از ستون عبور داده شد و برای مدت زمان ۲۴ ساعت به همان حالت باقی ماند و سپس با آب مقطر استریل شسته شد. راکتور با عبور اکسید اتیلن از میان ستون استریل گردید. اکسید اتیلن تا ۸ ساعت قبل از اینکه سیستم با نیتروژن استریل شسته شود، در ستون باقی ماند و خوراک و ظرف محصول با استفاده از بخار در فشار ۱۵ *psig* پاک‌سازی گردیدند.

پس از استریلیزاسیون، یک کشت بذر[3] ۲۴ ساعته به داخل ستون پمپ گردید. تقریبا ۴۸ ساعت به آن زمان داده شد تا سازگاری صورت گرفته و یک فیلم میکروارگانیسم روی حلقه‌های راشینگ قرار گیرد و با آن پیوند متقاطع[4] دهد. سپس محیط خوراک به داخل راکتور پمپ گردید. محاسبه دقیق زمان ماند در داخل راکتور دشوار بود، با توجه به این واقعیت که رشد و تکامل دی اکسید کربن ممکن است بخشی از فضای خالی موجود در بیوراکتور *ICR* را بگیرد و منجر به زمان ماند نادرست شود. ضخامت فیلم میکروبی را می‌توان با عبور متناوب نیتروژن استریل و یا دی اکسید کربن از ستون کنترل کرد و جلوی رشد بیش از اندازه سلول را گرفت.

از خوراکی با غلظت ۱۵ گرم گلوکز و ۱۵ گرم زایلوز در لیتر با شدت جریان ۲۰ تا ۲۰۰ میلی لیتر در ساعت استفاده گردید. از نقاط متوالی در طول راکتور نمونه گرفته شد و آنالیز متداول برای مصرف گلوکز و زایلوز، تولید اسیدهای آلی و

1. Immobilized Cell Reactor
2. Rasching Rings
3. Seed culture
4. Cross-link

دانسیته سلولی انجام گرفت. از نتایج حاصله مدلی سینتیکی برای رشد و تخمیر *P. acidi-propeonici* به دست آمد.

برای اندازه گیری دانسیته سلولی، غلظت قند و اسیدهای آلی از روش‌های تحلیلی استفاده گردید. کدورت محیط کشت (دانسیته نوری) با خواندن جذب از اسپکتروفوتومتر و شمارش سلولی تعیین شد. غلظت قند به عنوان تنها سوبسترا به وسیله آنالیزگر دیجیتال صنعتی اندازه گیری شد. غلظت کلی قند از طریق کاهش یک عامل کاهنده مثل دی نیترو سالیسیلیک اسید[۵] در محلول قلیایی محاسبه گردید. رنگ نارنجی تولید شده در دستگاه رنگ سنج[۶] در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. اسیدهای آلی با دستگاه کروماتوگراف گازی مجهز به آشکارساز *FID* [۷] تعیین گردیدند.

۳- نتایج و بحث

جدول ۳ مطالعات انجام گرفته در زمان‌های ماند مختلف را در درون راکتور ICR مورد مطالعه نشان می‌دهد. در این جدول غلظت‌های متفاوتی از دو سوبسترای قندی مورد استفاده (گلوکز و زایلوز) و همچنین مطالعات دانسیته سلولی صورت گرفته ارائه شده است.

با توجه به تحقیقات انجام شده بر روی بیوراکتور *ICR*، می‌توان یک مدل ریاضی برای عملکرد *ICR* با به‌کارگیری موازنه جرم کلی روی المانی از بیوراکتور به‌دست آورد. معادله دیفرانسیل ناهمگنی که تغییرات غلظت سوبسترا را بر حسب زمان و مکان بیان کند و از اصل پیوستگی سیال نیز پیروی نموده و همچنین مدل دینامیکی و موازنه مواد را نشان دهد در زیر خلاصه شده است:

$$\varepsilon_A \frac{\partial C_A}{\partial t} + u \frac{\partial C_A}{\partial Z} = r_A \qquad (۱)$$

که در آن ε_A حجم تهی یا فضای خالی بین بیومس در داخل بیوراکتور (ml)، C_A غلظت سوبسترا ($g.l^{-1}$)، u سرعت توده سیال در داخل بیوراکتور ($cm.h^{-1}$)، z طول محوری بیوراکتور (cm) و r_A سرعت واکنش در لایه تثبیت شده میکروبی است ($g.l^{-1}.h^{-1}$).

با فرض این که جریان لوله‌ای[۸] و پایدار باشد یعنی غلظت سوبسترا بر حسب زمان در یک موقعیت مکانی خاص تغییر محسوسی نداشته باشد معادله ۱ به صورت زیر ساده می‌شود :

$$u \frac{\partial C_A}{\partial Z} = r_A \qquad (۲)$$

ویژگی پایداری و جریان لوله‌ای در بیوراکتور *ICR* به‌کمک ردیاب[۹] مورد بررسی قرار گرفته و نتایج به دست آمده در جدول ۳ ارائه شده است. عموما سرعت واکنش برای سیستم‌های تخمیری ساده، با مدل مونود[۱۰] داده می‌شود. این مدل نرخ تبدیل ویژه ثابتی را برای سیستم تثبیت شده نشان می‌دهد. نتایج به‌دست آمده از سیستم *ICR* برای تولید اتانول در جدول۳ خلاصه شده است. اگر معادله سینیتکی مصرف قند را در بیوراکتور از نوع واکنش درجه اول با جریان محوری در شرایط پایا فرض کنیم معادله را می‌توان به صورت زیر ساده نمود [۱و۲]:

$$u \frac{\partial C_A}{\partial Z} = k C_A \qquad (۳)$$

معادله ۳ معادله دیفرانسیل خطی مرتبه اول براساس غلظت و طول راکتور است که غلظت سوبسترا را در طول بیوراکتور*ICR* محاسبه می‌کند. پس از جداسازی متغیرها می‌توان از رابطه ۳ به‌صورت زیر انتگرال گیری کرد :

$$\int_{C_{A_o}}^{C_A} \frac{dC_A}{C_A} = \int_0^L \frac{k\,.dz}{u} \qquad (۴)$$

با انتگرال گیری از معادله دیفرانسیل فوق رابطه ۵ حاصل می‌شود:

$$\ln \frac{C_A}{C_{Ao}} = \frac{kL}{u} \qquad (۵)$$

بنابراین رابطه‌ای خطی بین $\ln C_A / C_{A0}$ و طول بیوراکتور وجود دارد [۱و۲و۴].

5. Dinitrosalicylic acid
6. colorimeter
7. Flame ionization detector

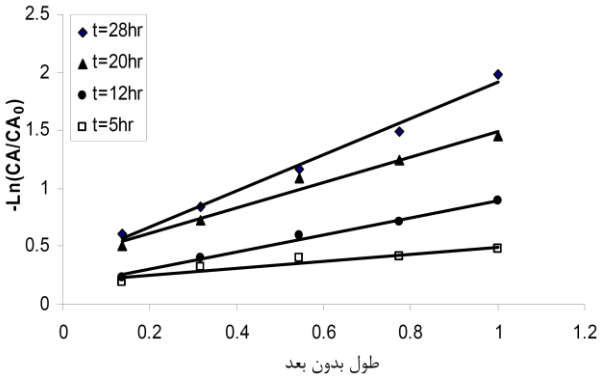
8. Plug flow
9. Tracer
10. Monod

جدول ۳- خمیر پیوسته یک راکتور ICR دارای دو سوبسترا(گلوکز،زایلن) در دمای ۳۶ درجه سانتیگراد

زمان نگهداری (ساعت)	طول راکتور (اینچ)	غلظت سوبسترا($g.l^{-1}$) گلوکز	زایلن	غلظت اسید آلی($g.l^{-1}$) اسید استیک	اسید پروپونیک	سرعت واکنش گلوکز ($g.l^{-1}.h^{-1}$)	دانسیته سل (تعداد سل/ml)
۲۸	۰	۱۵	۱۵	--	--		
	۶	۶/۲۸	۱۰	۷/۷۸	۱/۳	۰/۳۱	۹×۱۰^{۱۱}
	۱۴	۴/۵۲	۸/۶	۸/۵۴	۱/۹۸	۰/۳۷	۹×۱۰^{۱۱}
	۲۴	۲/۱۳	۷/۲	۱۲/۴	۲/۷	۰/۴۶	۹×۱۰^{۱۱}
	۳۴	۱/۳۶	۵/۴	۱۷/۲	۳/۲۵	۰/۴۹	۹×۱۰^{۱۱}
	۴۴	۱/۱۴	۳	۱۹/۱	۳/۹۵	۰/۴۹۵	۹×۱۰^{۱۱}
۲۰	۰	۱۵	۱۵	--	--		
	۶	۱۷/۱	۱۱	۶/۴۵	۱/۲	۰/۳۹۵	۹×۱۰^{۱۱}
	۱۴	۴/۷۲	۹/۸	۸/۱	۱/۴۶	۰/۵۱۴	$۹/۵\times۱۰^{۱۱}$
	۲۴	۲/۲۱	۷/۹	۱۲	۱/۸۷	۰/۶۴	$۹/۵\times۱۰^{۱۱}$
	۳۴	۱/۵	۷/۱۵	۱۶/۴	۲/۱۲	۰/۶۷۵	$۹/۵\times۱۰^{۱۱}$
	۴۴	۱/۲	۵/۸	۱۸	۲/۴	۰/۶۹	$۹/۵\times۱۰^{۱۱}$
۱۵	۰	۱۵	۱۵	--	--		
	۶	۹/۳	۱۴/۵	۱/۳۳	۲/۵۹	۰/۴۷۵	۱×۱۰^{۱۰}
	۱۴	۶/۰۲	۱۴	۲/۳۷	۳/۲۶	۰/۷۵	۲×۱۰^{۱۰}
	۲۴	۳/۶۲	۱۳	۲/۴۵	۴/۵	۰/۹۵	۳×۱۰^{۱۱}
	۳۴	۲/۶۵	۱۲	۲/۵	۵/۰۷	۱/۰۳	۳×۱۰^{۱۱}
	۴۴	۲/۳	۱۰	۲/۵۴	۵/۳۶	۱/۰۶	۵×۱۰^{۱۱}
۵	۰	۱۵	۱۵	--	--		
	۶	۹/۸	۱۵	۰/۵۸	۰/۵	۱/۰۴	۶×۱۰^{۱۰}
	۱۴	۷/۲۷	۱۴/۵	۰/۷۶	۰/۶	۱/۵۵	$۱/۸\times۱۰^{۱۰}$
	۲۴	۶/۰۵	۱۴	۱/۲	۰/۶۵	۱/۷۹	۵×۱۰^{۱۰}
	۳۴	۵/۸۴	۱۴	۱/۳۶	۰/۷	۱/۸۳	۵×۱۰^{۱۰}
	۴۴	۵/۲	۱۳	۱/۶۵	۰/۸	۱/۹۶	۶×۱۰^{۱۰}

شکل شماره ۲ نمودار $\ln C_A / C_{A0}$ را بر حسب تابعی از طول بدون بعد راکتور برای نتایج به دست از فرآیند تخمیر در غلظت‌های خوراک ۱۵ گرم در لیتر گلوکز و ۱۵ گرم در لیتر زایلوز در زمان ماندهای مختلف را نشان می‌دهد.

آزمایشات صورت گرفته در زمان ماندهای مختلف نشان داد که از نتایج به دست آمده در هر یک از این زمان ماندها خطوط مستقیمی به دست آمده است (شکل شماره ۲). به علت کاهش شدت جریان در طول بستر شدت شیب با افزایش زمان ماند افزایش پیدا می‌نماید.



شکل ۲- آزمون مدل راکتور ICR با استفاده از Propionibacterium acidipropionici

همچنین جدول شماره ۴ ثابت سرعت واکنش از نوع درجه اول را که توسط زمان ماندهای مختلف به دست آمده را نشان می‌دهد .

جدول ۴- مدل سینتیکی راکتور ICR برای Propionibacterium acidipropionici تثبیت شده روی آن

زمان بازداری T بر حسب ساعت	شدت جریان $ml.\ h^{-1}$	ثابت سرعت h^{-1}
۵	۲۱۴	۰/۷۹
۸	۱۳۵	۰/۶۹
۱۲	۹۰	۰/۶۸
۲۰	۵۵	۰/۶۸
۲۸	۳۸	۰/۵۱

۴- نتیجه گیری

مهم‌ترین مزیت روش تثبیت سلول‌های میکروبی، توانایی فعالیت، با بهره و فایده زیاد آنها است و این فعالیت در شرایطی که از سوبسترا با دبی زیاد و زمان ماند کوتاه استفاده شود کاربرد مطلوبی دارند. بیوراکتورهای تثبیت شده سلولی از راندمان محصول دهی بالائی برخوردار می‌باشند. نتایج به دست آمده از غلظت‌های متفاوت گلوکز و زایلوز نشان داده است که نتایج تجربی با مدلی که توصیف شد، مطابقت می‌نماید. شدت جریان در راکتورهای ICR حدود ۵ تا ۸ برابر سریع‌تر از راکتورهای اختلاط کامل می‌باشد. در راکتور ICR درصد تبدیل شکر در زمان ماند ۱۲ ساعت ۶۰ درصد بوده است که به مراتب بیشتر از راکتو اختلاط کامل می‌باشد. البته باید توجه داشت که با افزایش زمان ماند بازده در راکتور ICR و اختلاط کامل تقریبا یکسان می‌گردد. با توجه به آن که افزایش غلظت سوبسترا و محصول در بیوراکتور ICR موجب بازدارندگی فعالیت آنزیمی میکروب‌ها نخواهد شد لذا این بیوراکتورهای برای کاربردهای صنعتی بسیار مناسب می‌باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل به خاطر در اختیار قرار دادن امکانات مرکز تحقیقاتی بیوتکنولوژی آن دانشگاه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

واژه‌ها:

r_A = سرعت واکنش برحسب $g.l^{-1}.h^{-1}$

k = ثابت سرعت واکنش برحسب $l.h^{-1}$

C_A = غلظت قند برحسب $g.l^{-1}$

z = طول محوری راکتور برحسب cm

u = سرعت توده سیال برحسب $cm.h^{-1}$

مراجع

1. G.D. Najafpour, "Immobilization of Microbial Cells for the Production of Organic Acids", J. Sci. I. R. Iran, Vol. 1, No.3, (1990) 172-176.
2. G.D. Najafpour, Biochemical Engineering, Biotechnology, Elsevier Amsterdam, (2007).
3. I. Chibata, Immobilized Microbial Cells with Polyacrylamide Gel, Carrageenan and their Industrial Applications, Immobilized Microbial Cells, American Chemical Society, Washington D.C., (1979).
4. G.D. Najafpour, H. Younesi, "Ethanol Fermentation in Immobilized Cell Reactor (ICR) Using Saccharomyces cerevisiae", Biores. Technol., Vol. 92, No.3, (2004) 251-260.
5. G.D. Najafpour, "Organic Acids from Biomass by Continuous Fermentation", Resourc. Conserv. Vol. 13, (1987) 187-192.
6. I. Chibata, "Use of Immobilized Cell System to prepare Fine Chemical", Microb. Technol., Vol. 2, (1979) 361-433.
7. P. Brodelius, K. Mesback, "Immobilized Plant Cell." Adv. Appl. Microbiol., Vol. 28, (1982) 1-28.
8. P. Gikas, A.G. Livingston, "Specific ATP and specific oxygen uptake rate in immobilized cell aggregates: experimental results and theoretical analysis using a structured model of immobilized cell growth", Biotechnol. Bioeng., Vol. 55, (1997) 660-672.
9. A. Senthuran, V. Senthuran, B. Mattiasson, R. Kaul, "Lactic acid fermentation in a

reactor using immobilized Lactobacillus casei", Biotechnol. Bioengng., Vol. 55, (1997) 841 -853.

10. M.C. Flickinger, S.W. Drew, "Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation", Biocatalysis and Bioseparation Journal, Vol. 2, (1999) 939-948.
11. J.E. Baily, D.F. Ollis, Biochemical Engineering Fundamentals, Chapter 8, McGraw-Hill, New York, (1986).