

研究論文

固定化微生物の廃水処理への応用を目指した PVA 固定化担体の調製に関する基礎的研究

高橋 博,* 片平 圭治,* 佐藤 幸保,* 菊地 賢一*

Fundamental Study on Preparation of PVA Carriers for the Application of
Immobilized Microorganism to Waste Water Treatment

Hiroshi TAKAHASHI†, Keiji KATAHIRA†, Yukiyasu SATOH† and Ken-Ichi KIKUCHI†

Lactobacillus delbrueckii cells were immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel beads by using gelling reaction with PVA-boric acid-phosphate. The physical/chemical and fermentation stabilities of the immobilized cells were studied for the application of immobilized microorganism to waste water treatment. In the experiment of preparation of cell immobilized PVA beads, spherical and strong gel beads were formed at PVA concentration, 12 wt%, and boric acid concentration, 5 wt%. The gel beads had porous structure like spongy pore, and the cells were confirmed on the surface and the inside of the gel beads. The operational stability of the immobilized cell system was repeatedly studied in a batch fermentation. The system successfully operated for the 20 time repeated fermentations, and the gel beads were not damaged during all the runs.

Key Words : PVA beads, Immobilization, *Lactobacillus delbrueckii*, fermentation, boric acid, phosphoric acid

1. 緒言

微生物酸化処理による廃水処理は、微生物の代謝機能を利用して廃水中の BOD, COD などを低下させる処理法であり、現在様々な産業において幅広く研究・利用¹⁻⁶⁾されている。しかし、通常の微生物を利用する発酵操作とは異なり、流入水の組成、濃度、流量が時間的に変動すること、殺菌系での操作は困難であること、あるいは処理の過程で汚泥等の固体が大量に生成し、煩雑な固液分離操作を伴う場合があることなど、廃水処理特有の問題点が存在する。また、負荷変動に伴う微生物の増殖速度と流出速度の不釣り合いにより生じる washout の問題も潜在的に存在することから運転操作には慎重を期す必要がある。このような諸問題の多くは微生物を固定化することにより回避できることから、固定化微生物を利用した廃水処理に関する研究⁷⁾が数多く行われている。

微生物を固定化する手法としては、単体結合法、架橋法、包括法などがあるが、その簡便さから天然または合成高分子ゲルの格子内に菌体を封じ込める包括固定化法⁸⁾が多く行われており、固定化担体としては寒天、アガロースゲル、カラギナン、アルギン酸、キトサン、アクリルアミド、ポリウレタンなど⁸⁻¹⁰⁾が利用されてきた。しかし、廃水処理用固定化担体は、低コストであること、大量に造粒が可能であること、ゲルの強度が比較的高いことなどが求められることから、これらの特性

を満たす高分子包括材料の開発が望まれている。

その中で、ポリビニルアルコール (PVA) は工業規模で安価に生産される高分子材料の一つであり、微生物に対し毒性が低い特徴を有する。そのため、PVA を固定化担体として利用する研究が古くから数多く行われ¹¹⁻¹⁶⁾、現在においても固定化酵素の担体としての利用を含め様々な分野において研究¹⁷⁻²¹⁾が行われている。しかし、これらの多くの研究は固定化微生物の培養特性に関する報告が主であり、担体粒子の物性に及ぼす固定化条件の検討、さらには担体、固定化菌体の強度、あるいは物理的、化学的さらには発酵工学的観点から見た安定性等に関する研究は少ない^{8, 15, 16)}のが現状である。

そこで本研究では、固定化微生物の廃水処理への応用に関する基礎的研究の一環として、固定化担体として PVA に着目し、またモデル微生物として PVA への固定化例がない乳酸菌を選び、はじめに固定化条件の検討を行う。次いで、固定化微生物を用いて回分操作により繰り返し培養を行い、物理的、化学的ならびに生物学的な安定性について明らかにすることを目的とした。

2. 実験

2.1 試薬

実験で使用した PVA は、和光純薬工業 (株) 社製一級のポリビニルアルコールであり、平均重合度1000、完全けん化型の試薬を用いた。また、架橋反応には、和光純薬工業 (株) 社製市販特級試薬のほう酸、およびリン酸二水素アンモニウムを使用した。

2.2 培養実験

実験で使用した乳酸菌は、*Lactobacillus delbrueckii* IFO 3534 であり、Table 1 に示す組成の GYP 培地を用いて培養を行っ

平成18年1月25日受付;平成18年2月24日受理

* 秋田大学工学資源学部 環境物質工学科

〒010-8502 秋田市手形学園町1-1

† Department of Materials-process Engineering and Applied Chemistry for Environments, Faculty of Engineering and Resource Science, Akita University, 1-1, Tegata Gakuen-cho, Akita-shi 010-8502, Japan

Table 1 Composition of GYP cultivation medium

component	concentration [kg/m ³]
Glucose	10
Yeast extract	5
Polypeptone	5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1

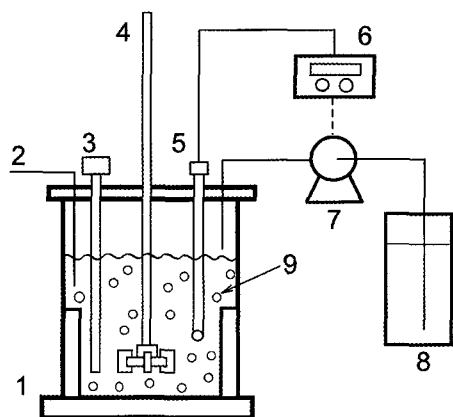
た。培養は、Figure 1 に示す発酵槽（丸菱理化学装置研究所社製 MD250, 内容積 2.6 dm³）を用いて行い、所定の量の固定化乳酸菌（あるいは固定化していない乳酸菌）を発酵槽に接種し、温度 37°C、回転速度 200 r.p.m. の下で回分操作により行った。実験中、任意の時間毎に培養液をサンプリングし、乾燥菌体濃度、グルコース濃度、乳酸濃度の定量を行った。

2.2 PVA 固定化乳酸菌の調製

PVA 固定化乳酸菌の調製はゲル包括法により以下に示す手順で行った。はじめに所定の濃度に調製した PVA 水溶液および約 15 時間振とう培養を行った乳酸菌培養液を等量混合し、十分に攪拌を行った。次いで、混合溶液を注射器に入れ、所定の濃度に調製したほう酸水溶液中に滴下するとともに 45 分間攪拌し、ほう酸による架橋反応を行った。その後、ほう酸水溶液から粒子を取り出し、10 wt% のリン酸二水素アンモニウム水溶液中で 3 時間懸濁し、リン酸によるエステル化反応を行った。すべての操作が終了した粒子は滅菌水を用いて十分に洗浄し、PVA 固定化乳酸菌として実験に供した。

2.3 分析

乳酸濃度の定量は、Barker-Summerson 法²²⁾、グルコース濃度は Nelson-Somogyi 法²³⁾ による比色法で行った。また、菌体の濃度は、所定の時間にサンプリングした培養液を希釈し、660 nm における濁度を測定し、乾燥菌体重量に換算して表した。固定化乳酸菌の表面および断面の分析は、固定化粒子を凍結乾燥した後、JEOL 社製走査型電子顕微鏡 JSM-5300 により行った。



1: fermentor 2: sampling tap 3: thermocouple
4: stirrer 5: pH probe 6: pH controller
7: pump 8: NaOH solution 9: immobilized cells

Figure 1 Schematic diagram of batch fermentation system.

Table 2 Kinetic parameters estimated from free-cell batch fermentation.

μ_m [hr ⁻¹]	g [hr]	$Y_{x/s}$ [kg-dry cells/kg-glu]	$Y_{p/s}$ [kg-lact/kg-glu]
0.41	1.7	0.13	0.73

3. 実験結果および考察

3.1 遊離乳酸菌の増殖特性

固定化乳酸菌の種々の評価を行うに先立ち、はじめに固定化を行わない遊離系において乳酸菌の培養を行い、増殖特性について調べた。

Figure 2 に実験結果の一例として、基質であるグルコースの初濃度を 48 kg/m³ とし、温度 37°C の下で培養を行った場合の菌体濃度、グルコース濃度および乳酸濃度の経時変化を示す。図より、遊離系における乳酸菌の増殖は約 10 時間程度の誘導期を経た後指数増殖期に移行し、約 30 時間程度で静止期に達することがわかる。また、本実験では pH のコントロールを行わなかったことから、基質であるグルコースの消費量は約 20% 程度とかなり低い値を示している。これは、乳酸の生成に伴い培地の pH が初期値 6.8 から 3.5 まで低下したこと、生成物阻害により増殖が停止したと考えられる。なお、図には示さないが、pH を 4.0 に制御した系で培養を行った場合には、基質の消費量 (33 kg/m³)、乳酸の生産量 (28 kg/m³) とともに増加したことから、本実験における生成物阻害の影響の裏付けが得られた。

また、実験結果を基に、増殖特性を表すパラメータである指数増殖期における最大比増殖速度 μ_m 、世代時間 g 、および消費グルコースあたりの増殖収率 ($Y_{x/s}$)、消費グルコースあたりの代謝産物収率 ($Y_{p/s}$) を求めた結果を Table 2 に示す。得られた値は培養の条件が異なるものの、Siebold et al.²⁴⁾ が求めた値とはほぼ同程度の値を示すことがわかった。

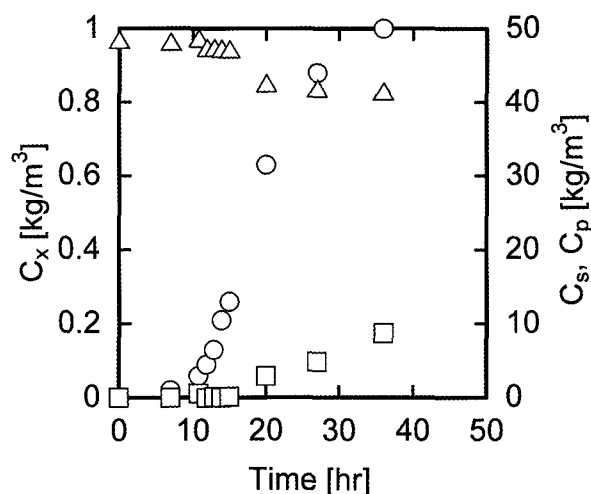


Figure 2 Time courses of cells concentration, (O), glucose concentration, (Δ), and lactic acid concentration, (□) in the free-cell batch fermentation. Conditions: Initial glucose concentration, 48 kg/m³; temp., 37°C.

Table 3 Effect of concentrations of PVA and boric acid solutions on gel formation.

PVA concentration [wt%]	H ₃ BO ₃ concentration [wt%]	Gel formation
5.0	3.0	discoidal
10.0	3.0	discoidal
10.0	4.5	discoidal
10.0	4.8	discoidal
10.0	5.0	discoidal
10.0	5.5	discoidal
12.0	5.0	spherical
15.0	5.0	spherical

3.2 PVA 固定化乳酸菌の調製法に関する検討

Hashimoto et al.²⁵⁾によれば、PVA 固定化粒子の調製に際し、架橋剤として使用するほう酸は、重合速度を速くするという観点から飽和濃度のほう酸水溶液を用いることが提案されている。しかし、飽和のほう酸はpHが4以下であることから、乳酸菌以外の菌体を固定化した場合、菌体の活性に影響を及ぼす可能性があると考えられる。一方、低濃度のほう酸水溶液で架橋反応を行った場合には、菌体へのストレスは小さくなると予想されるものの、固定化粒子の強度は低下すると考えられる。そこで、本研究では、架橋剤であるほう酸の濃度を低くすることにより菌体へのストレスを緩和すると共に、菌体と親和性の高いリン酸二水素アンモニウム水溶液を用いてゲルの一部をエステル化¹⁰⁾し、菌体への過度なストレスを避ける手法により固定化乳酸菌の調製を試みると共に調製条件の検討を行った。

Table 3に、種々のほう酸の濃度、PVA濃度における調製ゲルの硬さ、ならびに得られるゲルの形状を示す。PVAの濃度が10wt%以下の場合、ほう酸の濃度が3wt%においてもゲルが形成されたが、球形の粒子を得ることは不可能であった。しかし、PVA濃度が12wt%以上でかつほう酸の濃度が5wt%以上であれば硬い球形の粒子を得ることができたことから、以降の実験では、ほう酸の濃度を5wt%、PVAの濃度を15wt%

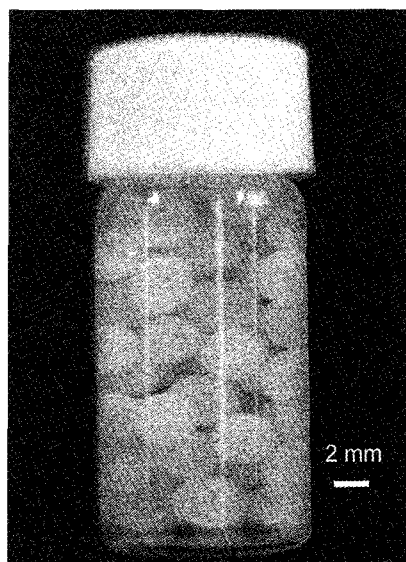
Photo. 1 Photograph of *L. delbrueckii* immobilized PVA gel beads.

Table 4 Physical properties of cells immobilized PVA beads

diameter [m]	density [kg/m ³]	water content [%]
3.5×10^{-3}	1.018×10^3	93.1

として固定化乳酸菌の調製を行った。Photo. 1に得られたPVA固定化乳酸菌の写真を示すと共に、Table 4に得られた粒子の物性を示す。表より、本手法で得られた粒子は、直径が約3.5mm、またピクノメータにより測定した粒子の密度は $1.018 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ 、さらに含水率は93.1wt%であり、培地の浸透性および水溶液中における懸濁性は良好であることがわかる。

3.3 固定化乳酸菌による培養実験

次に、ほう酸濃度5.0wt%、PVA混合溶液の濃度が15wt%の条件の下で調製した固定化乳酸菌を用いて培養を行い、固定化乳酸菌の培養特性について調べた。

Figure 3に、初期グルコース濃度を 10 kg/m^3 とし、固定化乳酸菌の粒子濃度が1vol%の下で回分操作により繰り返し培養を行った場合の、10回目の回分培養時 (b)) および遊離系による回分培養 (a)) における菌体濃度、グルコース濃度、および乳酸濃度の経時変化を示す。固定化乳酸菌を用いた場合、

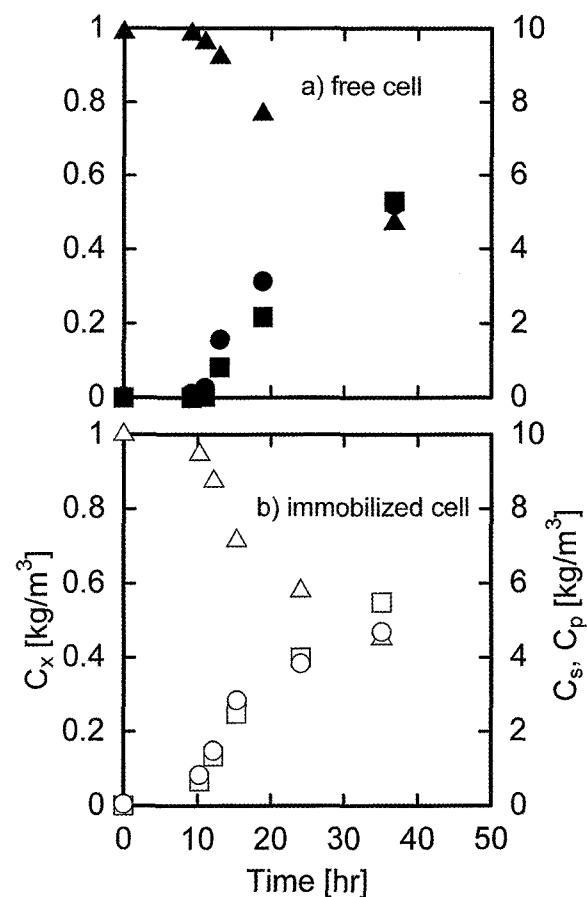


Figure 3 Time courses of cells concentration, glucose concentration, and lactic acid concentration in the free-cell batch fermentation, a), and immobilized cell fermentation, b). Keys: ○, ● cells concentration; △, ▲ glucose concentration; □, ■ lactic acid concentration.

培養液中でも乳酸菌の増殖ならびに乳酸の生産が行われていることから、担体の一部から乳酸菌が培地に供給され、培地中で乳酸菌が増殖し乳酸を生成していることがわかる。また、菌体濃度および乳酸濃度とも遊離菌の場合の値とほぼ同程度であり、PVA 固定化乳酸菌は菌体の供給源として十分に機能していることがわかる。

Figure 4 に、同一の固定化粒子を用いて回分培養を繰り返した場合の、培養回数と培地中に存在する菌体基準の増殖収率 $Y_{x/s}$ および乳酸の生産物収率 $Y_{p/s}$ の関係を示す。増殖収率ははじめの数回は比較的高いものの、その後培養回数を重ねるにつれてその値は徐々に低下する傾向を示している。一方、生産物収率は初回の培養では低い値を示したものの、2 回目の培養以降からはほぼ一定の値を示している。このことから、 $Y_{p/s}$ を $Y_{x/s}$ で除して得られる、溶液中に存在する単位菌体あたりの乳酸生産量は、培養回数が増加するにつれて上昇する傾向を示すことがわかる。これは、培養回数の増加に伴い、固定化粒子内の乳酸菌の増殖が進み、粒子内に存在する菌体による乳酸の生産割合が増加したためと考えられる。そこで、固定化担体中の乳酸菌による乳酸生産の割合を明らかにするために、固定化 PVA 粒子の濃度が 20 vol% の下で培養を行い、培地中に存在する乳酸菌の増殖速度と単位乳酸菌あたりの乳酸の生産速度との関係を調べた。

系内で生産される乳酸は、菌体の維持により生産される乳酸および菌体の増殖により生産される乳酸の和で表されると仮定し、Luedeking and Piret 式を拡張すると Eq. (1) が得られる²⁶⁾。そこで、培養回数 1 回から 3 回までのデータを用いて増殖曲線を基に Eq. (2) により増殖速度 μ を求め、Eq. (1) により解析を行った。

$$Q_p = \alpha \mu + \beta \quad (1)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu C_x \quad (2)$$

Figure 5 に溶液中に遊離している乳酸菌の増殖速度と乳酸の比生産速度の関係を示す。また、最小二乗法により Eq. (1) 中の傾きおよび切片を求めた結果を Table 5 に示す。図より、遊離菌および固定化菌体を用いたいずれの培養においても、乳酸の比生産速度は培地中に遊離している乳酸菌の増殖速度に比

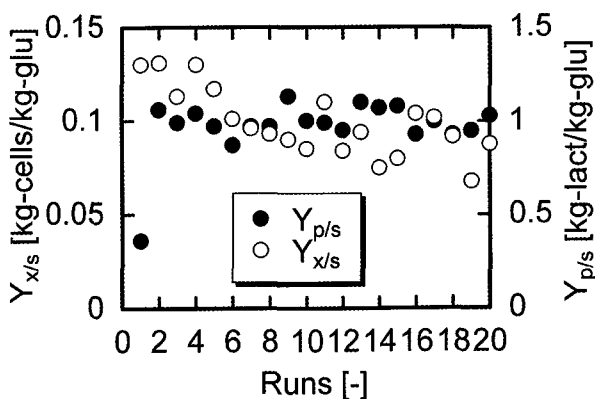


Figure 4 Relationship between cell and lactic acid yields, and batch runs in immobilized cell fermentations.

Table 5 Mathematical parameters determined by least-square method

Culture	α [kg-lact/kg-glu]	β [kg-lact/(kg-glu hr)]	Correlation coefficient
Free cell	8.1	0.31	0.98
Immobilized cell			
1 st	4.9	0.32	0.90
2 nd	8.3	0.25	0.95
3 rd	20.8	0.20	0.94

例して増加することがわかる。また、固定化乳酸菌を用いて繰り返し培養を行った場合、乳酸の比生産速度は 1 回目の培養においては遊離系で培養を行った場合よりも低くなる傾向を示したが、2 回目以降徐々に比生産速度が高くなり、比増殖速度に対する傾きが徐々に増加することがわかる。これは、乳酸は遊離した菌体のみならず固定化粒子内部にて増殖した乳酸菌によっても生産され、培養回数を重ねるにつれ粒子内の乳酸菌による生産割合が増加したためと考えられる。

3. 4 PVA 固定化乳酸菌の内部構造

これまでの結果より、PVA 固定化乳酸菌は担体の一部から培地中に乳酸菌を供給することが可能である他、粒子内部で増殖する乳酸菌により乳酸の生産が増加する事が明らかとなった。そこで、繰り返し培養を行った PVA 固定化乳酸菌の表面および内部を走査型電子顕微鏡で観察し、内部構造および菌体の分布について調べた。Photo. 2 に、回分培養を 9 回繰り返した後の PVA 固定化乳酸菌の表面 (a)), および粒子の断面 (b)) の SEM 像を示す。写真 a) の左側は粒子の表面全体を捕らえた SEM 像であるが、粒子表面には乳酸菌の巨大なコロニーが存在していることがわかる。また、右側の写真はコロニーの一部を拡大した写真であるが、無数の乳酸菌が表面近傍に密集して存在していることがわかる。したがって、固定化粒子を用いた場合に存在する培地中の遊離菌は、粒子表面近傍に存在する乳酸菌により供給されたものと考えられる。

また、Photo. 2 における b) の左側の写真によると、粒子内部の所々に大きな空洞が存在すると共に無数の小さな空孔が存

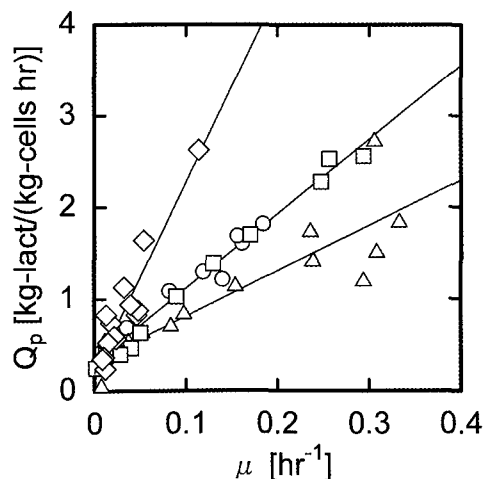
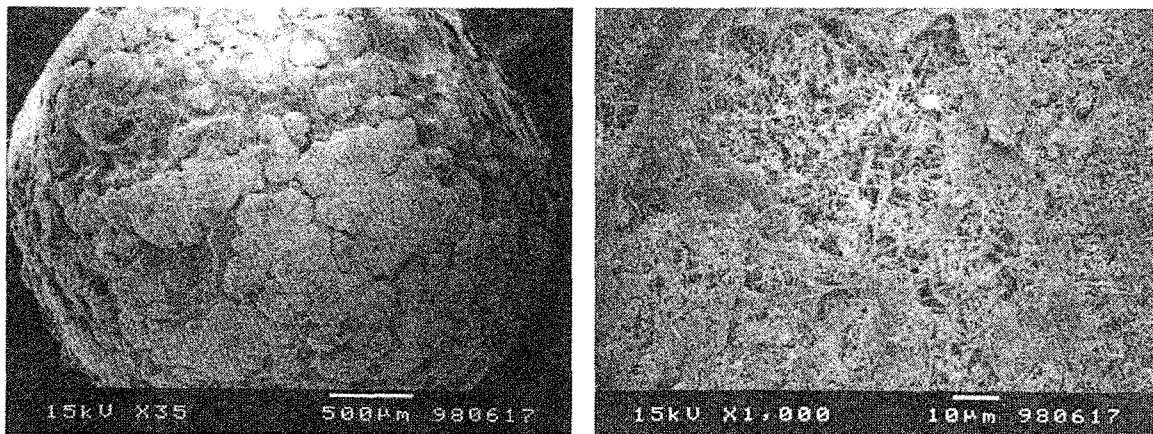
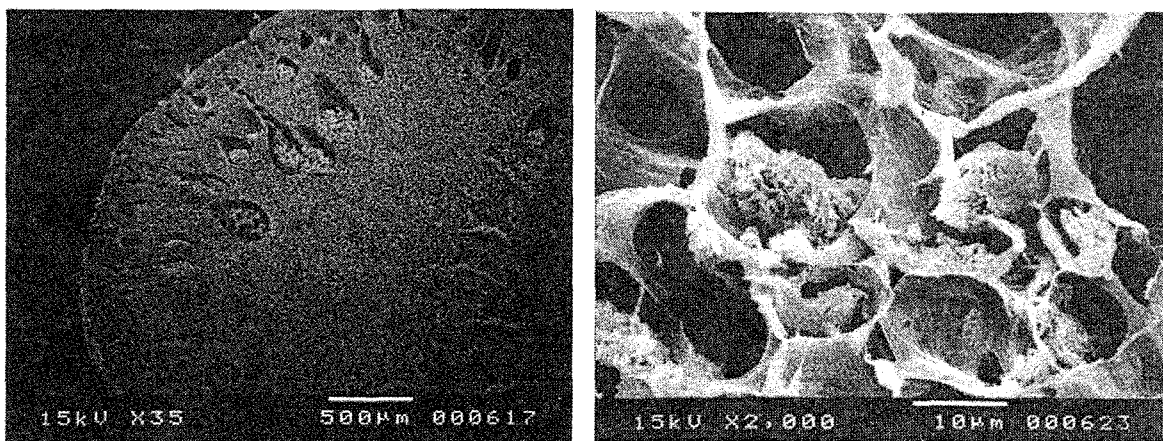


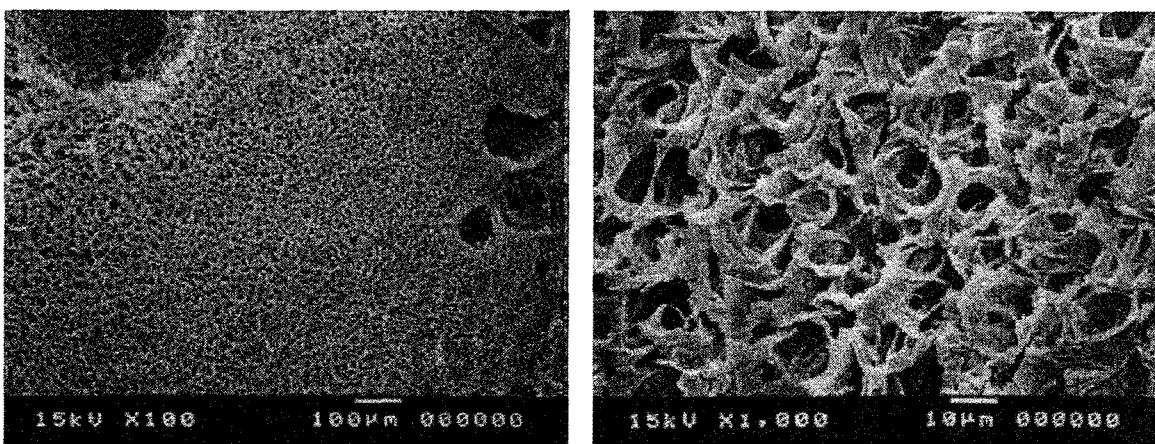
Figure 5 Relationship between specific lactic acid production rate and specific growth rate in immobilized cell fermentations. Keys: ○ free-cell fermentation; △ the 1st batch run; □ the second batch run; ◇ the 3rd batch run.



a) surface of *L. delbrueckii* immobilized gel beads after the 9th batch fermentation.



b) cross-section of *L. delbrueckii* immobilized gel beads after the 9th batch fermentation.



c) cross-section of PVA carrier soaked for 15 hr in 100 mol/m³ NaOH solution after the 20th batch fermentation

Photo. 2 Scanning electron microscopic photographs of cell immobilized PVA after the 9th batch fermentation, a), b), and PVA carrier soaked in alkaline solution after the 20th batch fermentation, c).

にしている事がわかる。また右側の写真は小さな空孔の一部を拡大した写真であるが、粒子内に存在する空孔の大きさは約10 μm 程度であり、その一部には乳酸菌のコロニーが存在している事がわかる。したがって、乳酸の生産速度の増加は、主に表面近傍あるいは粒子内部に存在している乳酸菌により生じたと考えられる。一方、c) に示す画像は回分培養を20回繰り返した後の粒子を、100 mol/m³の NaOH 水溶液に15時間浸漬することにより内部に存在する乳酸菌を溶菌し、固定化粒子の三次元構造を調べた写真である。図より、内部は10 μm 程度の空孔が複雑に重なり合い、高次の編み目構造が海綿状に形成されていることがわかる。また、含水率は Table 4 に示すように93%程度であることから、培地の成分がこれらの空孔を通じて供給され、粒子内部に存在する乳酸菌による乳酸の生産が活発に行われたことが考えられる。また、PVA 粒子は100 mol/m³の NaOH 水溶液で溶菌処理を行ってもその基本骨格が維持されていることから、今回調製した粒子は pH3.5から13までの幅広い範囲の pH において化学的にも安定に使用できることが明らかとなった。

4. 結 言

固定化微生物の廃水処理への応用を目指し、PVA-ほう酸架橋固定化乳酸菌の調製とその培養特性に関する研究を行った結果、以下の結論を得た。

モデル微生物として培養中に pH が大きく変動する乳酸菌を用い、PVA 固定化乳酸菌をゲル包括法により調製した結果、PVA の濃度が12 wt%以上、ほう酸の濃度が5 wt%以上の条件下で造粒した後リン酸によるエステル化反応を行うことにより球状でかつ硬い固定化粒子を得ることができると明らかとなった。また、得られた粒子は比重が1.02、含水率が93%程度であり、水溶液中における分散性・懸濁性が良好であることが明らかとなった。

PVA 固定化乳酸菌を用いて回分操作により培養特性を調べた結果、単位グルコースあたりの乳酸の生産物収率は20回の培養を通じてほぼ一定の値を示し、固定化菌体は安定に利用できることが明らかとなった。また、溶液中に存在する単位菌体あたりの乳酸生産量は培養回数が増加に伴い上昇する傾向を示し、固定化担体中に存在する乳酸菌による乳酸の生産割合が増加したことが示唆された。

PVA 固定化粒子内部を SEM により観察したところ、乳酸菌は粒子表面近傍に大量に存在していることが明らかとなった。また、粒子内部には10 μm 程度の空孔が多数存在し、その一部にも乳酸菌がコロニーを形成していることが明らかとなった。また、水酸化ナトリウム水溶液により乳酸菌の溶菌処理を行った粒子を観察したところ、アルカリによる溶菌処理を行ったにもかかわらず架橋された基本骨格は維持され、高次の編み目構造が海綿状に形成されていることがわかった。これより、本固定化担体は pH3.5から13までの幅広い pH 範囲において化学的に安定に使用できることが明らかとなった。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、(財)秋田県資源技術開発機構 松島桂英 氏ならびに学部学生 手塚結貴嬢より多大な協力をいただきました。付記して謝意を表します。

Nomenclature

C_l =lactic acid concentration	[kg/m ³]
C_g =glucose concentration	[kg/m ³]
C_x =dry-cell concentration	[kg/m ³]
g =generation time	[hr]
Q_p =specific lactic acid production rate	[kg-lact/(kg-cells hr)]
$Y_{x/g}$ =cell yield to glucose	[kg-cells/kg-glucose]
$Y_{p/g}$ =lactic acid yield to glucose	[kg-lact/kg-glucose]
α =constant for Eq.1	[kg-lact/kg-cells]
β =constant for Eq.1	[kg-lact/(kg-cells hr)]
μ_m =maximum specific growth rate	[hr ⁻¹]
μ =specific growth rate	[hr ⁻¹]
<subscripts>	
lact=lactic acid	
glu=glucose	

References

- 1) G. T. Tellz, N. Nirmalakhandan and J. L. Gardea-Torresdey: Performance Evaluation of an Activated Sludge System for Removing Petroleum Hydrocarbons from Oilfield Produced Water, *Adv. in Environ. Res.*, 6 (2002) 455-470.
- 2) T. C. Ma, P. L. Chan, H. Lawford, H. Chua, W. H. Lo, and P. H. Yu: Properties of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Produced by Bacteria Isolated from Activated Sludge Obtained from the Municipal Wastewater Works in Hong Kong, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 122 (2005) 731-740.
- 3) Neyens, J. Baeyens, B. D. Heyder and M. Weemaes: The Potential of Advanced Treatment Methods for Sewage Sludge, *Manage. of Environ. Qual.*, 15 (2004) 9-16.
- 4) B. N. Jacobsen and E. Arvin: Biodegradation Kinetics and Fate Modeling of Pentachlorophenol in Bioaugmented Activated Sludge Reactors, *Water Res.*, 30 (1996) 1184-1194.
- 5) G. W. Chen, I. L. Chang, W. T. Hung and D. J. Lee: Regimes for Zone Settling of Waste Activated Sludges, *Water Res.*, 30 (1996) 1844-1850.
- 6) U. Lechner, R. Baumbach, D. Becker, V. Kitunen, G. Auling, M. S. Salonen: Degradation of 4-Chloro-2-Methylphenol by an Activated Sludge Isolate and Its Taxonomic Description, *Biodegradation*, 6 (1995) 83-92.
- 7) S. Hashimoto, K. Furukawa and H. Hana: Fundamental Study on Immobilization of Activated Sludge and Its Characterization of Biodegradation, *Gesuidokyoukaishi*, 23 (1986) 16-22.
- 8) K. C. Chen and Y. F. Lin: Immobilization of Microorganisms with Phosphorylated Polyvinyl Alcohol (PVA) gel, *Enzyme Microb. Technol.*, 16 (1994) 75-83.
- 9) S. Kinoshita, M. Muranaka and H. Okada: Hydrolysis of ϵ -Aminocaproic Acid Cyclic Dimmer by Cells

- Entrapped in Acrylamide Gel, *J. Ferment. Technol.*, 53 (1975) 223-229.
- 10) D. Jain and T. Ghose: Cellobiose Hydrolysis using *Pichia Etchellsii* Cells Immobilized in Calcium Alginate, *Biotechnol. and Bioeng.*, 26 (1984) 340-346.
 - 11) S. Shindo and M. Kamimura: Immobilization of Yeast with Hollow PVA Gel Beads, *J. Ferment. Bioeng.*, 70 (1990) 232-234.
 - 12) H. Seki and T. Suzuki: Fundamental Study on The Recovery of Heavy Metals by Humic Acid-Immobilized PVA Membrane, *Hokudaisuisankahou*, 43 (1992) 185-192.
 - 13) H. Asano, H. Myoga, M. Asano and M. Toyao: Nitrification Treatability of Whole Microorganisms Immobilized by The PVA-Freezing Method, *Water Sci. Technol.*, 26 (1992) 2397-2400.
 - 14) W. Jianlong, Q. Xiangchun and H. Liping: Microbial Degradation of Quinoline by Immobilized Cells of *Burkholderia Pickettii*, *Water Res.*, 36 (2002) 2288-2296.
 - 15) L. Doretto, D. Ferrara, P. Gattolin and S. Lora: Amperometric Biosensor with Physically Immobilized Glucose Oxidase on a PVA Cryogel Membrane, *Talanta*, 44 (1997) 859-866.
 - 16) S. G. Velizarov, E. I. Raihina, A. P. Sinitsyn and S. D. Varfolomeyev: Production of L-lysine by Free and PVA-Cryogel Immobilized *Corynebacterium Glutamicum* Cells, *Biotechnol. Lett.*, 14 (1992) 291-296.
 - 17) K. S. Chang, W. L. Hsu, H. Y. Chen, C. K. Chang and C. Y. Chen: Determination of Glutamate Pyruvate Transaminase Activity in Clinical Specimens Using a Biosensor Composed of Immobilized L-Glutamate Oxidase in a Photo-Crosslinkable Polymer Membrane on a Palladium-Deposited Screen-Printed Carbon Electrode, *Analt. Chim. Acta.*, 481 (2003) 199-208.
 - 18) M. S. Antczak, T. Antczak and S. Bielecki: Stability of Extracellular Proteinase Productivity by *Bacillus Subtilis* Cells Immobilized in PVA-Cryogel, *Enzyme Microb. Technol.*, 24 (2004) 168-176.
 - 19) S. Guobin, X. Kianmin, G. Chen, L. Huzhou and C. Jiayong: Biodesulfurization Using *Pseudomonas Delafieldii* in Magnetic Polyvinyl Alcohol Beads, *Lett. Appl. Microbiol.*, 40 (2005) 30-36.
 - 20) K. S. Atia and E. B. Ai: Preparation of Glucose Oxidase Immobilized in Different Carriers Using Radiation Polymerization, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80 (2005) 805-811.
 - 21) A. Higuchi, M. Kurihara, K. Kobayashi, S. C. Chong, T. Akaike and M. Hara: Albumin and Urea Production by Hepatocytes Cultured on Extracellular Matrix Proteins-Conjugated Poly (vinyl alcohol) Membrane, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 16 (2005) 847-860.
 - 22) S. B. Barker and W. H. Summerson: The Colorimetric Determination of Lactic Acid in Biological Materials, *J. Biol. Chem.*, 138 (1941) 535-554.
 - 23) S. Fukui: "Seibutukagakujikkenhou", University of Tokyo Press, (1973) 10-12.
 - 24) M. Siebold, P. V. Frieling, R. Joppien, D. Rindfleisch, K. Schugerl and H. Roper: Comparison of the Production of Lactic Acid by Three Different Lactobacilli and Its Recovery by Extraction and Electrodialysis, *Process Biochem.*, 30 (1995) 81-95.
 - 25) S. Hashimoto and K. Furukawa: Immobilization of Activated Sludge by PVA-Boric Acid Method, *Biotechnol. Bioeng.*, 30 (1987) 52-59.
 - 26) A. Raucourt, D. Girard, Y. Prigent and P. Boyaval: Lactose Continuous Fermentation with Cells Recycled by Ultrafiltration and Lactate Separation by Electrodialysis: Model Identification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30 (1989) 521-527.