

석유탄화수소를 이용한 단세포단백질의 생산에 관한 연구

—Ⅲ. *Candida tropicalis* KIST 351 에 대하여—

변 유 량 · 권 태 완

(한국과학기술 연구소 식량자원 연구실)

Production of Single-Cell Protein on Petroleum Hydrocarbon

—Ⅲ. On the Growth of *Candida tropicalis* KIST 351—

PYUN Yoo-Ryang and Tai-Wan KWON

(Food Resources Lab., Korea Institute of Science and Technology)

ABSTRACT

The growth characteristics of *Candida tropicalis* KIST 351 on gas oil substrate under different culture conditions were investigated and the preliminary animal feeding experiments using this yeast as a partial substitute of fish meal was also conducted.

The yeast assimilates effectively n-paraffins in gas oil ranging from C₁₆ to C₁₈ with its maximum cell growth at 33°C and pH 5.5 with aeration of 3 vvm and agitation of 900 rpm. The optimal concentrations of nitrogen sources, KH₂PO₄ and Na₂HPO₄ were 4, 2 and 0.5 g/l, respectively. Ferrous sulfate, manganese sulfate and zinc sulfate showed positive effect to cell growth with the optimal range of 5-10 ppm.

In the feeding experiment with 3 and 5% incorporation of the gas oil grown yeast, neither adverse effects on growth of chicks nor toxic effect were observed.

Protein content of the dried cell was 58.8%, and its amino acid composition compared well with other single-cell protein products and FAO reference protein.

緒 論

최근에 와서 인구증가에 대처하기 위한 식량 문제, 특히 단백질식량문제가 긴박히 대두되고 있음에 즈음하여, 번식속도가 빠르고 단백질함량이 높은 석유자화균체를 공업적으로 대량배양하여 새로운 단백질자원으로 활용하고자 하는 연구가 세계 여러 나라에서 활발히 진행되고 있다. 우리나라에서도 단세포단백질의 국내 생산을 조속히 실현하여 우선 도입단백질 사료와 대체함으로써 사료부족을 완화하여 축산업의 전진한 발전을 도모하고 의화를 절약하여야 할 것이며,

나아가서 직접적인 식용단백질 자원으로 활용하여야 할 것이다. 본 연구소에서는 이와같은 단세포단백질의 국내개발을 위하여 이의 연구를 계속하고 있으며 이미 그 연구의 일부를 보고한 바 있다. 여기서는 전보에 밝힌바 있는 산업적 실용균주 중의 하나인 *Candida tropicalis* KIST 351의 최적배양조건 검토와 예비동물사육실험 등을 실시한 바 그 연구 결과를 보고한다.

材料 및 方法

사용균주

균부대 유훈칩지토양으로부터 분리한 *Candida tropicalis* KIST 351 을 사용하였다.

배지의 조성

실험의 기본배지는 1l 당 $(NH_4)_2SO_4$, 5.0 g; KH_2PO_4 , 2.5g; Na_2HPO_4 , 2.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.6 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5mg; 및 yeast extract, 100mg 을 함유하고 있으며 pH는 6.0 이다. 사용한 탄화수소는 시판경유이며 일부 실험에서는 n-alkane(K&K. Laf. Inc., USA)을 사용하였고, 배지의 조성을 달리하였을 때는 그때그때 명시하였다.

배양방법

플라스크 배양의 접종 및 배양방법은 전보에 기술한 바와 같다. 일부실험은 본연구실에 도입된 28l 용량의 microferm(Model CMF-128s, New Brunswiek Scientific Co. Inc., USA)을 사용하였다. 이때의 working volume은 10l로 하였으며 배양온도 및 pH는 자동조절하였고 교반속도는 600~1000 rpm, 통기량은 1~4 vvm으로 약 30시간 배양하였다.

균체의 증식도 측정 및 회수

플라스크 배양에 있어서 균체의 농도는 전보와 동일방법으로 측정하였으며 microferm 배양시의 균체의 증식도는 1N-NH₄OH 첨가량으로부터 구했다. pH 저하속도는 균체의 증식도와 상관성을 가지고 있으므로 pH를 일정하게 유지하기 위하여 첨가된 NH₄OH 양으로부터 균체의 증식을 간접적으로 측정할 수 있음은 여러 연구자들에 의하여 발표된 바 있으며, 그림1에서 보는 바와 같이 기울기가 일치됨을 알 수 있다. 배양 종료후 균체의 분리 및 용매처리방법은 전보와 같다.

균체의 성분분석

조단백질, 조지방, 회분등은 상법에 의하여 측정하였으며 아미노산 조성은 GLC법 및 auto analyzer를 사용한 이온교환법에 의하여 분석하였다. 균체의 RNA 함량은 Schneider 법으로 분석하였다.

예비동물 사육실험

동물사육실험은 본 연구소의 동물사료연구실의 주관하에 동연구실의 부속양계장에서 시행되었다. 시험계는 starbro 초생주이며 암수동수 구당 8수씩 3구로 하였다. 시험사료의 단백질 및

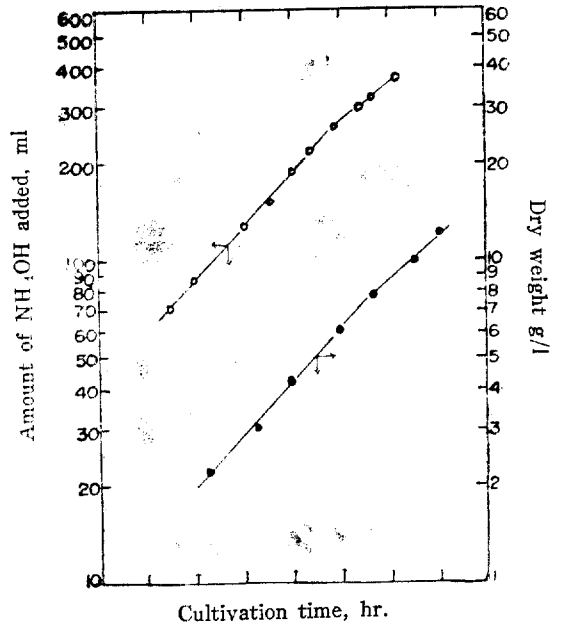


Fig. 1. Typical growth curve of *Candida tropicalis* KIST 351.

칼로리는 각각 20%, 2770 Cal. 수준으로 고정하였으며 대조구용의 어분배합량 8%에 대하여 어분을 본시제품으로 각각 3%, 5% 대체한 것을 사용하여 본 단세포단백질의 독성여부 및 단백질 영양가에 대한 기초자료를 얻고자 하였다. 시험사료의 배합율은 表1에 표시한 바와 같으며 시험기간은 3주로 하였다. 체중은 실험개시일로부터 매주 1회 일정시각에 측정하였고 주당시험중

Table 1. Formulas of experimental diets

Ingredient	C (control)	T-1 (SCP, 3%)	T-2 (SCP, 5%)
Yellow corn	61.0%	61.0%	61%
Fish meal	8.0	5.0	3.0
SCP	—	3.0	5.0
Soybean meal	15.0	15.0	15.0
Perilla meal	6.0	6.0	6.0
Wheat bran	6.0	6.0	6.0
Dicalcium phosphate	1.3	1.3	1.3
Oyster shell	2.0	2.0	2.0
NaCl	0.4	0.4	0.4
Vitamin mixture	0.3	0.3	0.3
Total	100.0	100.0	100.0

로서 체중에서 개시시 체중을 감하여 증체량으로 하였다. 사료섭취량은 매주 1회 일정시각에 잔류사료량으로부터 구하였다. 사료효율은 전시험기간 중의 각 구별 주당 사료섭취량을 주당증체량으로 나누어 구하였다.

結果 및 考察

배양조건의 검토

1. 배양온도 및 pH의 영향

그림2에 배양온도와 pH가 비증식속도에 미치는 영향을 나타내었다. 배양온도에 관한 실험은 2.5l 실험실 발효조를 사용하였으며 pH변동에 관한 실험은 microferm을 사용하였다. 최적온도는 33°C로서 이때의 비증식속도는 0.211 hr⁻¹였으며, 36°C에서의 비증식속도는 0.194hr⁻¹로서 비교적 잘 자랐다. 이미 보고된 바에 의하면 *Candida tropicalis*의 통기배양에 있어서 최적온도는 38°C라 하였으며 Chepigo는 pilot plant의 조업중 40°C에서 잘 생육하는 효모를 선발하였다고 한다. 고온성 균주의 선발은 경제적인 면에서 매우 중요한 것이다. 그림 2에서 보는 바와 같이 본 균주의 최적 pH는 5.5이며 이때의 비증식속도는 33°C에서 0.197hr⁻¹였다.

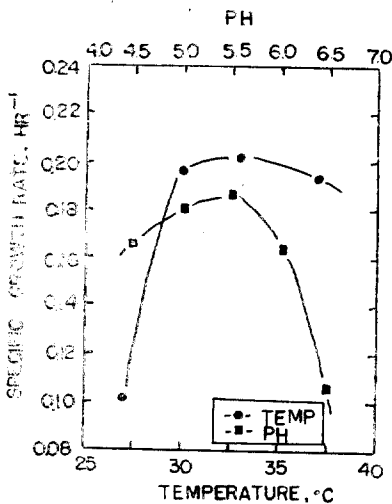


Fig. 2. Effect of temperature and pH on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351

2. 질소원의 종류 및 농도의 영향

질소원으로 3개의 무기질소염과 요소를 사용하여 이들 질소원이 균체증식에 미치는 영향을 플라스크 배양으로 검토하였다(表 2). 요소를 제외한 초안, 염안, 유안에서는 대차없이 증식이 양호하였다. 이는 전보의 *Candida tropicalis* KIST 359와 유사한 성질로서 질소원의 종류에 별 영향을 받지 않음을 나타낸다. 유안농도가 증식에 미치는 영향은 농도증가에 따라 점진적으로 증식이 양호하여 4g/l의 농도에서 가장 증식이 양호하였으며 그 이상 농도에서는 증식 저해현상을 보였다.

Table 2. Effect of nitrogen sources and concentration on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351

Nitrogen sources (0.5%, W/V)	Absorbance	Concentration of (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	Absorbance
NH ₄ NO ₃	0.44	1	0.59
NH ₄ Cl	0.44	2	0.63
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.43	3	0.63
(NH ₄) ₂ CO	0.24	4	0.65
		5	0.56
		6	0.55

gas oil : 10%, v./v.
culture time : 40 hrs, exp.with 500 ml flask

3. 유기영양원의 영향

여러가지 유기영양원에 대한 예비실험결과 yeast extract가 가장 양호하였으며 yeast extract의 첨가량이 탄화수소산화성에 미치는 영향을 表3에 나타내었다. 탄화수소산화성균의 유기영양원에 대한 상세한 연구는 보고된바 없으나 Takahashi 등의 *Candida tropicalis* S315Y의 8종의 유기영양원에 대한 연구결과에 의하면 유기영양원은 균체수율과 증식속도에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 그러나 본 실험에 의하면 yeast extract을 50 mg 첨가하므로써 무침가지보다 3배의 증식을 보였으며 그 이상 첨가하였을 때는 별영향이 없었다.

4. 인산염과 마그네슘염의 영향

그림3에 인산염과 마그네슘염의 영향을 나타내었다. KH₂PO₄ 및 Na₂HPO₄의 농도는 각각

Table 3. Effect of yeast extract concentration on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351

Concentration of yeast extract(mg/l)	Absorbance
0	0.13
50	0.37
100	0.38
150	0.39
200	0.42
250	0.39
300	0.37

Gas oil : 10%(v/v)

Culture time : 40 hrs., exp. with 500 ml flask

2g/l, 0.5g/l에서 최적치를 보였고 Ertola등과 Singh 등이 발표한 바와같이 인산염의 농도의 증가는 균체증식에 영향을 주지 않았다. 한편 탄화수소 산화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 Mg 이온은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로서 2g/l 일때 균체증식이 가장 양호하였다. 이는 전보의 *Candida tropicalis* KIST 359의 0.5g/l보다 훨씬 높은 농도이며, Takeda의 보고에 의하면 탄화수소 발효에 있어서는 일반미생물대사에 이용되는 양보다 훨씬 많은 1~5g/l의 농도가 필요하다고 하였다.

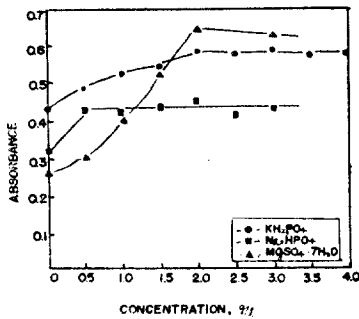


Fig. 3. Effect of phosphate and magnesium concentration on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351

5. 기타 금속이온의 영향

表4에 표시한 바와 같이 중금속이온으로서 Fe^{++} , Mn^{++} 및 Zn^{++} 이온은 효모의 증식을 향상시켰으며 그 적합한 농도는 5~10 ppm 였으나 기타 이온은 별영향을 나타내지 않았다. 이는 Champagnat 등이 발표한바와 일치되는 결과이다.

Table 4. Effect of metal ions on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351

Concentration (ppm)	Fe^{++}	Mn^{++}	Zn^{++}	Cu^{++}	Mo^{+6}	Ca^{++}
0	0.55*	0.41*	0.37*	0.46*	0.58*	0.48*
0.01	—	0.41	0.40	0.46	0.59	0.48
0.1	—	0.43	0.41	0.42	0.59	0.46
1.0	0.63	0.44	0.46	0.42	0.54	0.46
5	0.72	0.47	0.52	0.37	0.58	0.46
10	0.74	0.33	0.43	—	0.61	0.46
25	—	0.36	—	—	0.60	0.47
50	—	—	0.47	—	—	0.47
100	—	0.25	—	—	—	0.39

*Absorbance

Basal medium : gas oil 10%(v/v), $(NH_4)_2SO_4$ 4g/l, KH_2PO_4 2g/l, Na_2HPO_4 0.5g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 mg/l, yeast extract 50mg/l

Culture time : 40hrs., exp. with 500ml flask

6. 통기와 교반

탄화수소발효에 있어서 탄소원이 물에 불용성이고 그 분해반응이 산화적이므로 통기와 교반은 매우 중요한 인자이다. Darlington은 탄화수소발효의 경우 환수화물의 경우보다 약 3배의 산소가 필요하다고 계산하였다. 이와같은 통기량의 영향을 검토하기 위하여 microferm의 교반속도를 800 rpm으로 고정시켜 놓고 통기량을 1~4vvm으로 변화시켜 보았다.

表5에 나타낸 바와 같이 통기량이 증가될수록 비증식속도는 증가하여 4vvm에서 가장 빨랐으나 비탈로 인하여 상당량의 배지가 감소되는 현상이 관찰되었다. 한편 그림4의 증식곡선을 살펴보면 균체농도가 높아지면 모든 증식곡선의 기울기가 같아진다. 이는 본 발효조의 산소공급 능력이 한정되어 제한인자로 작용하기 때문일 것이다. Johnson은 탄화수소 발효에 있어서 산소공급이 제한인자이며 특히 발효 후반기에 증식속도는 산소공급에 의하여 제한받을 것이라 보고하고 있다. 여기서 탄화수소 발효의 생물화학공학적 문제점이 제거되며 산소전달이 우수한 발효조의 개발이 요망된다.

탄화수소 발효의 제 2의 특징은 기질이 물에 불용성이란 점이다. 따라서 산소공급 이외에 기

계적 교반에 의하여 탄화수소를 유화분산시키는 것이 중요하다. microferm의 통기량을 3vvm으로 고정시켜 놓고 교반속도를 600~1000 rpm까지 변화시켜 교반의 영향을 검토하였다. 表5에서 알 수 있는 바와 같이 교반속도가 증가될수록 비증식속도도 증가되었으나, 1000 rpm에서는 오히려 훨씬 감소되었다. 교반강도와 유적의 직경과의 관계는 Aiba 등에 의하여 처음으로 정량화되었으며 교반속도가 높아질수록 탄화수소 유적의 표면적이 커지게 되어 발육속도가 빨라지게 된다.

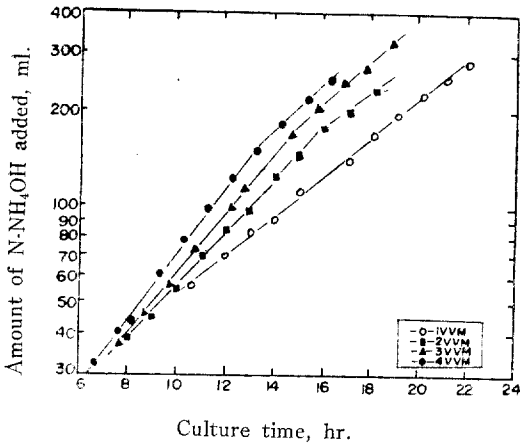


Fig. 4. Effect of aeration rate on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351

Table 5. Effect of aeration and agitation on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351

Aeration rate (vvm)	Specific growth rate (hr ⁻¹)	Agitation (rpm)	Specific growth rate (hr ⁻¹)
1	0.155	600	0.177
2	0.191	700	0.210
3	0.211	800	0.211
4	0.247	900	0.211
		1000	0.147

7. n-paraffin 탄소수의 영향

C₁₂~C₁₈(b. pt. 214°C~317°C)의 n-paraffin을 각각 탄소원으로 하여 그 자화능을 비교하였다. 그림 5에 표시한바와 같이 n-paraffin의 탄소수가 증가될수록 잘 자화되어 고비점인 C₁₆~C₁₅이 가장 잘 자화되었으며 351균주는 일반적으로 잘 알려져 있는바와 같이 우수의 n-paraffin이 잘

자화되었다. 한편 *Torulopsis* 속인 231 균주는 오히려 기수의 n-paraffin이 우수보다 잘 자화되는 경향을 보였다. Miller 등은 heptadecane에서 배양한 균체가 다른 우수의 n-paraffin에서 배양한 균체보다 지방함량이 높다고 보고하고 있다. 231 균주가 지방함량이 높고 단백질함량이 낮은 점은 Miller 등의 연구와 일치되며 자화된 기수의 n-paraffin은 다른 대사산물의 생성에 많이 이용되기 때문일 것이다. 우수 및 기수의 n-paraffin을 각각 잘 자화하는 351과 231 균주를 혼합배양하므로써 기질을 효과적으로 이용할 수 있을 것이 기대된다.

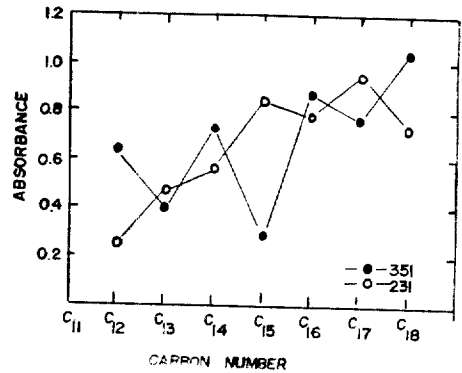


Fig. 5. Effect of Carbon number of n-paraffin on the growth of *Candida tropicalis* KIST 351 and *Torulopsis* sp. 231.

예비 동물 사육실험

전시험기간 동안의 각 구별 수당 평균증체량, 사료섭취량 및 사료효율은 表 6과 같다. 증체량은 대조구에 비하여 본 시제품을 혼입한 양시험구가 높았으며, 3% 혼입구의 사료섭취량이 많았다. 사료효율은 본시제품 3% 혼입구가 2.07로서 가장 우수하였고 5% 혼입구는 대조구보다 약간 저하되었다. 본시험에서는 시험계의 수가 적고 시험기간이 짧으므로 더욱 검토할 여지가 많이 남아있으며 앞으로 좀더 세밀한 실험이 진행되어야 할 것이다, 예비적인 이 실험결과를 검토해 볼 때 본 단세포단백질의 시제품에서 독성현상이 인정되지 않았다. 석유탄화수소를 기질로 한 단세포단백질의 사료가치와 안전성에 관한 자료는 한정되어 있으나 BP의 gas oil 공정에서 생산된 호도의 broiler에 대한 5~7주간의

사육실험결과에 의하면 건조균체의 소화율은 72%였으며, 어분대신 7.5% 및 10% 혼입하여도 아무런 저해현상이 없었으나 15% 혼입하였을 때 약간의 저해현상이 발생되었다고 한다. 이 이의 Chinese Petroleum 및 일본에서 단편적으로 발표된 자료에 의하면 산란계, broiler 및 돼지의 사료에 SCP를 10~15% 혼입하여도 어박, 대두박 등 기타 단백질에 손색이 없으며 장기 사육실험 결과에서도 조직의 변화, 발암성이나 기타 악영향이 인정되지 않았다고 한다. 그러나 안전성이 아직 명확하게 규명된 것은 아니며 앞으로 정밀한 화학분석·사육시험·안전성시험을 충분히 실시하여야 하며 제조과정 중에서도 철저한 품질관리가 요청된다고 할 것이다.

균체의 성분분석

表7에서 보는 바와 같이 균주 351의 조단백질 함량은 58.8%로서 전보의 균주 359와 거의 동량의 함량을 갖고 있으며, 국내외에서 선발된 석유산화효모에 비하여 손색이 없었다.

비증식속도에 따른 핵산함량을 추적하기 위하여 대수증식기에 시료를 채취하여 핵산함량을 분석하여 본 결과 (表8) 건조균체의 핵산함량은 3~5.2%였으며 증식속도가 증가될수록 핵산함량은 높아졌다. PAG에서는 하루에 2g 이하의 핵산을 섭취할 것을 권장하고 있는바, 장차 단세포단백질의 식용화를 위하여 핵산함량을 줄일 수 있는 적절한 가공방법의 개발이 요망된다.

균체단백질의 사료화 내지 식용화에 있어서 조단백질함량과 동시에 필수아미노산 조성이 때

Table 6. Effect of KIST-SCP as a substitute of fishmeal in diets on the growth rate and the feed efficiency of baby chicks.

Treatment	Days tested day	Chicks tested head	Average weight gain g/chick	Average feed intake g/chick	Feed efficiency
C	7	8	55.9	106.8	1.91
	14	8	104.2	209.5	2.01
	21	8	105.6 (265.75)*	237.6 (553.9)*	2.25 (2.08)**
T-1	7	8	66.1	118.6	1.79
	14	8	114.1	215.1	1.88
	21	8	105.1 (285.38)	257.3 (591.0)	2.45 (2.07)
T-2	7	8	60.4	98.6	1.63
	14	8	110.3	223.9	2.03
	21	8	108.6 (279.25)	304.9 (627.4)	2.81 (2.25)

*subtotal
**average

Table 7. Composition of dried cells of *Candida tropicalis* KIST 351

Crude protein	58.8%
Lipid	1.2
Ash	3.7
Phosphorus	1.2

Table 8. Ribonucleic acid content of dried cells of *Candida tropicalis* KIST 351

specific growth rate, hr ⁻¹	RNA content %
0.107	3.00
0.165	3.96
0.169	4.49
0.182	4.93
0.187	5.20

Table 9. Essential amino acid composition of yeasts grown on petroleum hydrocarbon(% in protein)

Amino acids	KIST-351	KIST-359	BP ⁽²⁵⁾ Lavera	BP ⁽²⁵⁾ Grangemouth	IFP ⁽²⁶⁾	Kanegafuchi Chemical ⁽²⁷⁾	FAO reference protein
Lysine	8.52	10.00	7.8	7.0	10.7	7.52	4.2
Methionine	1.14	1.20	1.6	1.8	0.7	1.22	2.2
Cystine	2.67	1.95	0.9	1.1	—	1.76	2.0
Isoleucine	4.71	6.33	5.3	4.5	4.8	5.45	4.2
Leucine	8.92	9.12	7.8	7.0	8.2	6.93	4.8
Phenylalanine	5.08	6.00	4.8	4.4	4.3	4.36	2.8
Threonine	5.96	3.87	5.4	4.9	3.2	5.08	2.8
Tryptophan	*	*	1.3	1.4	1.7	1.22	1.4
Valine	4.25	5.95	5.8	5.4	6.3	5.43	4.2

*Not determined.

우 중요하다. 表 9에 본균주와 공업화단계에 있는 의국의 석유단세포 단백질의 아미노산 조성을 비교하였다. 본 351 균주는 FAO 표준단백에 비하여 methionine 이의 다른 아미노산 함량은

높아 우수한 조성을 가지고 있으며 lysine 함량은 8.54%로 BP 및 중연화학의 제품보다 우수하나 전보의 359 균주 및 IFP 효모보다는 낮다.

摘 要

유류침적토양으로부터 분리한 *Candida tropicalis* KIST 351 을 플라스크 또는 28l microferm에서 배양하면서 여러가지 배양조건을 검토하고 예비동물사육을 실시한 바 이를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 본균주의 최적배양온도 및 pH는 각각 33°C, 5.5였으며, 적합한 통기 속도와 교반속도는 각각 3vvm 및 900 rpm 이었다.
- (2) 본균주는 C₁₆~C₁₈의 n-paraffin 을 가장 잘 자화하였으며, 질소원, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ 및 MgSO₄·7H₂O 의 최적농도는 각각 4g/l, 2g/l, 0.5g/l 및 2g/l 였다. 금속이온으로서 Fe⁺⁺, Mn⁺⁺ 및 Zn⁺⁺은 균체증식을 향상시켰으며 그 적합한 농도는 5-10ppm 였다.
- (3) 예비동물 사육실험결과 어분과 대등한 사료단백질로서의 가치가 인정되었으며 아무런 독성현상이 나타나지 않았다.
- (4) 건조균체의 단백질함량은 58.8%였으며 핵산함량은 3.0~5.2%였다. 아미노산 조성은 FAO 표준단백질에 비교할만 한 때, lysine 함량은 높으며 methionine 함량이 다소 낮다.

시제품의 동물사육실험을 실시하여 주신 본연구소 동물사료연구실의 김춘수 박사과 지규만 연구원, 그리고 균체서의 아미노산 조성을 분석하여 주신 국립공업연구소 식품공업과 박계인 과장과 박경태 연구원에게 심심한 사의를 표하는 바이다.

引 用 文 獻

1. Anon. 1970. C & EN, 21
2. Anon. 1968. *J. Ferment. Association*, 26(5), 42
3. Anon. 1970. The Japanese. of zoo technical Science, Supplement. 41 (3), 20
4. Aiba S., K.L. Haung, V. Moritz and J. Someya 1969. *J. Ferment. Technol.*, 47, 211
5. Bennett, I.C., J.C. Hondermarck and J.R. Todd 1969. *Hydrocarbon Processing* 48, 104
6. Champagnat, A., Ch. vernalt, B. Laine and J. Filosa, 1963. *Neftekhimiya*, 3, 799
7. Chepigo, S.V. 1967. 7th World Petroleum Congress, Mexico
8. Decerle, C., S. Franckowiak and C. Gatellier 1969. *Hydrocarbon Processing* 48, 109
9. Darlington, W.A. 1964. *Biotech. & Bioeng.*, 6, 241
10. Ertola, R.L. and M.J. Johnson, 1965. *ibid.* 7, 309
11. Ertola, R.L., L.A. Mazza, P.A. Balatti and S.F. Segoria, 1969. *J. Ferment. Technol.*, 47, 563
12. FAO/WHO/UNICEF PAG Statement No.4, 1970.
13. Johnson, M.J. 1964. *Chem. Ind.*, 36, 1532
14. Jolly, S.C. 1963. Official standardised and Recommended Methods of Analysis, Society for Analytical Chemistry, W. Heffer and Sons Ltd., Cambridge
15. Ko, P.C. 1967. Paper presented at the International Conf. on the SCP, MIT, Cambridge
16. Miller, T.L. and M.J. Johnson, 1966. *Biotech. & Bioeng.*, 8, 549
17. Miller, T.L. and M.J. Johnson, 1966. *Biotech. & Bioeng.*, 8, 567
18. Singh, M.D., P.K. Borua, M. Chakra. varty., J. N. Baruah and. M.S Iyenger, 1970. *J. Gen. Appl. Microbial.*, 16, 91
19. Takahashi, J., Y. Kawabata and K. Yamada 1965. *Agr. Biol. Chem.*, 29, 292
20. Takata, T. 1969. *Hydrocarbon Processing*, 48, 99
21. van Weerden, E.J., C.A. Schacklady and P. van der Wal, 1970. *British Poultry Science*, 11, 189

22. Wang, D.I.C. 1969. *Chem. Engr.*, **75**, 99
23. 권태완, 민태익, 박용, 변유량, 1970. 한국식품과학회지 **2** (2), 56
24. 박용, 민태익, 변유량, 권태완, 1970. *ibid.*, **2** (2), 61
25. 水野重樹, 1969. 核酸と一般的分離・定量法, 東京大學出版會, 東京
26. 日本特許 昭 40-24512.
27. 朝井勇宣, 1970. 醱酵協會誌, **28** (1), 14