

Cassava 澱粉을 이용한 검정곰팡이(*Aspergillus niger*)의 菌體生産에 관한 研究

方晶熙·金種協*

梨花女大 大学院 藥學科 *同德女大

Studies on the Mycelial Production of *Aspergillus niger* with Use of Cassava Flour Starch

Jeong-Hee Bang and Jong-Hyup Kim *

Dept. of Pharmacy, Graduate school, Ehwa Woman's University, Seoul 120, Korea and

*Dong-Duck Women's University, Seoul 136, Korea

ABSTRACT: *A. niger* IMI 41873 was shake-cultured in Cassava starch medium, then mycelial dry weight and mycelial protein were measured. The effects of Cassava starch concentrations, various nitrogen sources and concentrations on the levels of mycelial production and mycelial protein were investigated. The results were as follows; In each medium containing 4%, 6%, 8% and 10% of Cassava starch, mycelial production was 13.35 mg/ml, the medium containing 6% of Cassava starch was proved to be most effective. The levels of mycelial protein in shake culture with medium of 6% Cassava starch and NaNO_3 (1.5 g/l) were the highest. Among nitrate, ammonium sulfate, and urea, the nitrate was the most effective on mycelial production.

KEYWORDS: *Aspergillus niger*, Cassava, mycelial production.

캣사바 전분을 원료로 하여 곰팡이를 배양하는 착상은 미국의 Gray(Gray, 1966) 교수에 의해서 발표되었고 사용된 균주는 *Cladosporium sp.*, *Brachysporium oosporum*, *Linderina pennisporea* 등 2~3종의 불완전 균주를 사용하였다(Gray 등, 1966). 영국에 있어서는 가격이 저렴한 전분질 예컨대 Cassava, 당밀 등을 발효기질로 하여 *Fusarium gramine*을 사용했으며 1970년 하반기부터 대량 배양했다고 한다.

캣사바 전분을 효모균의 배양에 사용하려고 할 때는 전분을 당화하여야 하는 조작이 필수적이다. 효모균의 경우 동물체내나 인체내에서 쉽게 분해, 이용된다고 밝힌 연구논문은 드물다. 따라서 곰팡이 균체는 그 길이가 육안으로 식별될 정도로 크고 여과 조작면에서나 육안 관찰면에서, 그리고 소화성에 있어서 효모균보다는 많은 장점이 있는 것으로 생각된다. 곰팡이를 캣사바 전분에서 배양한다면 복잡한 당화조작이 생략되고 배양이 쉬우며 균체의 회수가 용이하고 섬유상이어서 식품 및 조리 가공면에서 커

다란 이점을 가진다(Gray 등, 1966-a; Brook 등, 1969; Gray, 1966; Gray 등, 1966-b; Gray 등, 1966-c).

식물성 단백질을 가축에 투여하여 얻는 동물성 단백질의 생산효율에 비해 무기질소와 전분을 가지고 미생물을 배양하여 얻는 균체단백의 효율은 수 배나 높다(Bhattacharjee, 1970; Han 등, 1971).

본 연구에서는 가격이 저렴한 캣사바의 전분을 이용하여 검정곰팡이(*Aspergillus niger*)를 배양함으로써 균체단백(single cell protein)을 효율적으로 얻고자 연구를 하였다. 이 균체단백은 가축사료용으로, 나아가서는 인류의 식량으로 전환하는데 이바지 할 것으로 생각이 된다.

材料 및 方法

재 료

Aspergillus niger van Tieghem(IMI 41873) 균주를 실험에 사용하였다. 곰팡이의 배양에 사용한

갓사바(*Manihot esculenta*, Grantz)는 태국산으로 분말상태이었다.

배 지

1) 감자 글루코오스 사면배지(Potato glucose slant agar)

감자 60g을 썬 후 껍질을 벗기고 마쇄한 후 물 200 ml를 가하였다. 여액에 포도당 4g, 한천 3g을 넣고 끓인 후 고압멸균하였다.

2) 정치배양용 배지(Liquid culture medium)

정치배양용 배지로 Czapeck-Dox 배지를 사용하였다. Czapeck-Dox 배지의 성분은 Table I과 같다.

3) 진탕배양 배지(Shake culture medium)

포자발아용 진탕배양 배지는 기초 무기염류 용액(Basal minerals)의 10배 농축액 20 ml, 황산암모늄 792 mg, 글루코오스 4g을 증류수에 녹여 전체량을 200 ml가 되게 한 후 pH를 2.3으로 정확히 조정하였다.

이와같이 제조한 배지를 250 ml 삼각플라스크에 50 ml씩 넣고 멸균한 후, 고압멸균하였다. 기초 무기염류 용액의 조성은 Table II와 같다.

Table I. The composition of Czapeck-Dox medium(pH=6.5).

Components	Contents (g/l)
Glucose	30.0
NaNO ₃	3.0
K ₂ HPO ₄	1.0
KCl	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
FeSO ₄	0.01

Table II. Components of basal minerals for the liquid media.

Minerals	Contents (mg/l)
KH ₂ PO ₄	100
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250
CuSO ₄ · 8H ₂ O	0.234
FeSO ₄ · 7H ₂ O	6.32
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.1
MnCl ₂ · 4H ₂ O	3.5
CaCl ₂	46.7

4) Cassava 전분을 이용한 배지

Czapeck-Dox 배지(이하 기본배지라 칭함)의 glucose 대신 Cassava의 전분을 사용하였으며 Cassava의 전분량을 4%, 6%, 8% 및 10%가 되게 하였다. 그 조성은 Table III과 같다. 기본 배지(Table I)의 glucose 대신 Cassava의 전분량을 6% 되게 넣고 질소원의 종류는 NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ 및 Urea를 사용하였으며 질소원의 양을 기본 배지 중 질소원량의 50%, 100% 및 100%에 Peptone의 양을 배지의 0.1%가 되게 가한 배지를 만들었다. 그 조성은 Table IV와 같다.

또 기본 배지의 glucose 대신 Cassava를 6% 함유시키고 질소원의 종류는 NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ 및 Urea를 사용하고 각 질소원의 양을 기본 배지의 질소원량의 50%, 100%, 200%, 400% 및 800%로 하고 모든 배지에 대하여 Yeast extract를 배지의 0.1%만큼 첨가한 배지를 만들었으며, 대조군으로 NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ 및 Urea 각각에 대하여 Yeast extract를 가하지 않고 질소원량이 100%인 배지를 만들었다. 그 조성은 Table V와 같다.

곰팡이의 배양방법

계대배양된 검정곰팡이를 무균상태로 감자-글루코오스 사면배지에 접종하여 28°C에서 7일간 항온배양하여 포자를 얻었다.

1) 전분액화효소 생산배양

감자-글루코오스 사면배지에서 배양된 검정곰팡이의 포자를 멸균증류수에 현탁시키고 이 현탁액을 소결유리판(Sintered glass filter 1.G, 3)을 사용하여 포자를 얻었다. 이 포자 현탁액을 500 ml의 Czapeck-Dox 배지액을 가한 1,000 ml 비이커에 이식시키고 두께 2 cm되는 솜을 가제로 싸서 덮은 후

Table III. The composition of various cassava conc. in Czapeck-Dox medium(pH=6.5).

Components	Conc. of Cassava starch (unit; g/l)			
	4 %	6 %	8 %	10 %
Cassava starch	40	60	80	100
NaNO ₃	3.0	3.0	3.0	3.0
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0
KCl	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5
FeSO ₄	0.01	0.01	0.01	0.01

Table IV. The composition of various nitrogen sources in modified Czapeck-Dox medium containing peptone(pH=6.5).

(unit; g/l)

Components	Various nitrogen sources								
	NaNO ₃			(NH ₄) ₂ SO ₄			Urea		
	*50%	100%	100%	*50%	100%	100%	*50%	100%	100%
Cassava Starch	60	60	60	60	60	60	60	60	60
NaNO ₃	1.5	3	3						
(NH ₄) ₂ SO ₄				**1.67	2.33	2.33			
Urea							**0.53	1.06	1.06
Peptone			1			1			1
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KCl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
FeSO ₄	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

*% value is referred to that of NaNO₃ level in original Czapeck-Dox medium. The nitrogen amount of NaNO₃ in Czapeck-Dox medium is 100%

** According to the nitrogen amount of NaNO₃ in Czapeck-Dox medium, that of (NH₄)₂SO₄ and Urea is calculated.

Table V. The composition of various nitrogen sources in modified Czapeck-Dox medium containing yeast extract(pH=6.5).

(unit; g/l)

Components	Various nitrogen sources														
	NaNO ₃					(NH ₄) ₂ SO ₄					Urea				
	50%	100%	200%	400%	800%	50%	100%	200%	400%	800%	50%	100%	200%	400%	800%
Cassava starch	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
NaNO ₃	1.5	3	6	12	24										
(NH ₄) ₂ SO ₄						1.67	2.33	4.66	9.32	18.64					
Urea											0.53	1.06	2.12	4.24	8.48
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
KCl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
FeSO ₄	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

* 0.1% yeast extract is added in to all medium

30°C에서 5일간 정치 배양하였다. 정치배양 후 비이커를 충분히 잘 흔들어 섞은 후 여지를 통해 여과하여 효소액을 얻었다. 이 효소액을 냉장고에 4°C로 보관하였다.

2) 포자발아용 진탕배양

멸균증류수를 사면배양된 검정곰팡이에 붓고 백금

선으로 끊어 포자와 균사의 현탁액을 얻고 이를 소결유리판(1,G,3)으로 포자를 여과한 후 여액 1ml를 A배지에 접종시켜 진탕배양하였다. 접종후 30°C의 진탕배양기내(120 strokes/min)에서 48시간 배양하여 포자를 발아시키고 균등한 연령의 균사를 얻었다.

Cassava 전분의 액화처리

250 ml 삼각플라스크에 전분질을 농도별로 넣고 전분질 1g에 대해 5ml의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 고압멸균하고, 추출한 효소액을 40 ml 가하여 50°C에서 24시간 동안 액화시켰다.

Cassava 배지를 이용한 곰팡이의 진탕배양

1-c의 진탕배양 결과 얻어진 균사들을 취하여 미리 멸균된 나이론제 Cheeze cloth로써 걸러내었다. 멸균증류수로 2회 세척하고 멸균해 놓은 스파튜라로써 미리 제조하여 고압멸균해 놓은 Cassava 배지에 접종하였다. 이때 배지는 250 ml 삼각플라스크에 50 ml를 넣었다.

접종 후 플라스크를 진탕배양기의 고정장치에 고정시키고 30°C에서 1분간 왕복 120회 속도로 4일 동안 배양하면서 매 24시간마다 pH, 균체량 및 균체 단백을 측정하였다.

균체량, 균체단백 및 배지의 성분측정

1) 균체량의 측정

미리 무게를 칭량한 나이론제 치즈클로스로써 배양물을 여과하여 균체를 받고 증류수로 2회 세척하여 항온건조기 내에서 85±1°C로 8시간 동안 건조시켰다. 건조기에서 1시간 동안 보존 후 건조량을 화학천칭으로 0.1 mg 단위까지 정확히 칭량하였다.

2) 균체의 총 단백질의 측정

검정곰팡이의 총 단백질을 측정하기 위하여 Chesson 등의 방법을 이용하였다. 균체의 총 단백질량의 정량방법은 Lowry법을 사용하였으며 정량용 표준물질로는 Bovine serum albumin(Sigma Co.)을 사용하였다.

균체단백의 정량 : Cassava의 전분량을 변화시킨 배지에서 진탕배양하여 얻은 균체를 85±1°C로 8시간 동안 건조시킨 다음 건조기에서 보존 후 그 건조균체 10 mg씩을 각각 취하여 막자사발에 넣고 증류수를 0.5 ml 가한 후 10분 동안 갈아서 혼합되면 1 N NaOH 2 ml를 가하고 100°C에서 5분 동안 가열한 다음 다시 증류수를 넣어 전체량을 10 ml로 맞추었다. 그 10 ml중 각각 1 ml씩을 취하여 표준단백질과 함께 Lowry 정량용 시약 2 ml를 넣고 35°C에서 5분 동안 정치시켰다. 다음에 Folin 시약 1 ml씩을 넣고 35°C에서 15분 동안 발색시킨 다음 자외선분광광도계로서 흡광도를 측정하고 표준검량곡선을 이용하여 정량하였다.

3) Cassava 배지 중의 환원당 측정

3,5-Dinitrosalicylic acid 용액을 사용하였다.

Cassava 전분은 미리 액화처리를 하고 Cassava의 전분량을 4%, 6%, 8% 및 10%되게 한 배지를 각각 2 ml씩 취하고 표준용액과 같은 방법으로 하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량곡선을 이용하여 정량하였다.

結果 및 考察

균체량의 측정

Cassava의 전분을 이용한 배지내의 성분이 검정곰팡이의 균체생산과 총 단백질에 미치는 영향을 검토하기 위하여 Table III의 배지를 사용하여 검정곰팡이를 30°C에서 4일 동안 진탕배양하면서 매 24시간마다 균체량을 측정하였다. Cassava의 전분량이 4%, 6%, 8% 및 10%일 때 96시간 배양된 각각의 mg/ml 및 9.93 mg/ml로서 6% 함유구에서 가장 많은 증가를 나타내고 있다(Fig. 1).

질소원의 종류 및 양을 변화시키고 Peptone을 0.

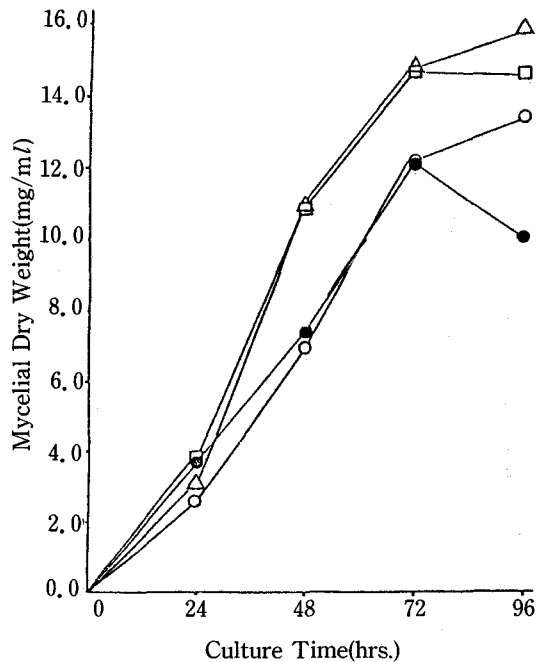


Fig.1. Mycelial mass of *A. niger* during fermentation in modified Czapeck-Dox medium shown in Table III.

- : 4% Cassava starch
- △-△: 6% Cassava starch
- : 8% Cassava starch
- : 10% Cassava starch

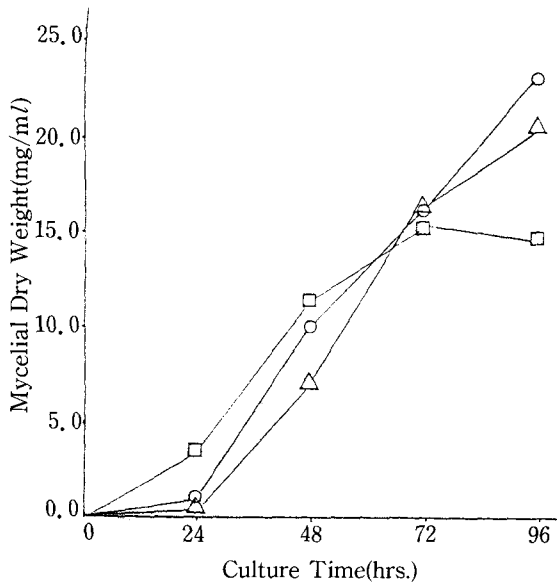


Fig.2. Mycelial mass of *A. niger* during fermentation in various amounts of NaNO₃.

○-○: 50% NaNO₃
 △-△: 100% NaNO₃
 □-□: 100% NaNO₃+0.1% peptone

1% 함유시킨 배지 (Table IV)를 사용하여 검정곰팡이를 30°C에서 4일 동안 진탕배양하면서 매 24시간마다 균체량을 측정하였다. 질소원이 NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ 및 Urea인 경우의 균체량의 변화는 Fig. 2, Fig. 3 및 Fig. 4와 같다.

또한 질소원의 종류 및 양을 변화시키고 Yeast extract를 가한 배지 (Table V)를 사용하여 검정곰팡이를 30°C에서 4일 동안 진탕배양 후 측정된 균체량은 Table VI과 같다.

Cassava 배지 중 환원당 측정

Cassava 배지 중 환원당을 측정하기 위하여 사용한 표준용액인 Maltose액의 표준검량곡선은 Fig. 7과 같다. Cassava 배지를 액화처리한 후 배지 중 Cassava의 전분량이 4%, 6%, 8% 및 10%일 때 표준검량곡선에 의한 환원당의 정량은 Table VII과 같다.

검정곰팡이 (*Aspergillus niger*)를 실험균주로 하여 배지 중 Cassava의 전분량, 질소원의 종류 및 양을 변화시켜 배양하면서 이들이 균체생산 및 균체단백의 함량에 미치는 영향을 추구하고 있다.

Cassava의 전분이 4%, 6%, 8% 및 10% 함유된 배지에서 검정곰팡이를 진탕배양하면서 균체량을 측

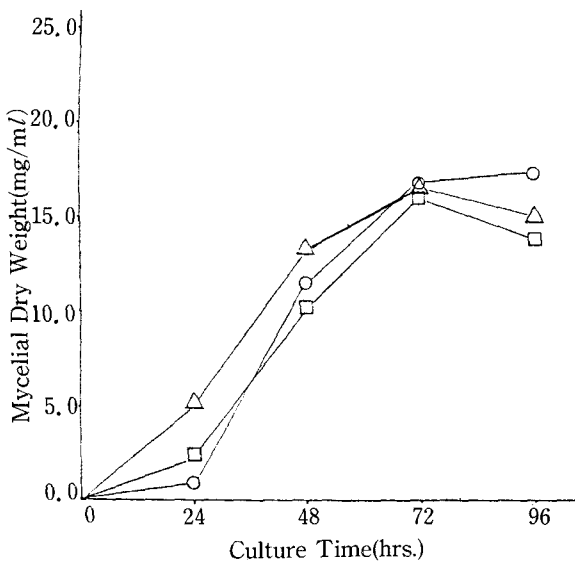


Fig.3. Mycelial mass of *A. niger* during fermentation in various amounts of (NH₄)₂SO₄.

○-○: 50% (NH₄)₂SO₄
 △-△: 100% (NH₄)₂SO₄
 □-□: 100% (NH₄)₂SO₄+0.1% peptone

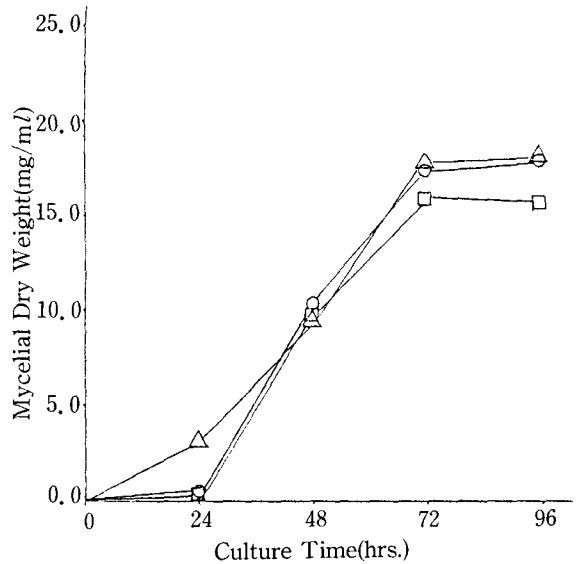


Fig.4. Mycelial mass of *A. niger* during fermentation in various amounts of urea.

○-○: 50% Urea
 △-△: 100% Urea
 □-□: 100% Urea+0.1% peptone

Table VI. Mycelial dry weight in several nitrogen sources in modified Czapeck-Dox medium shown in Table III.

Nitrogen sources and *Amounts(%)		Dry Weight (mg/ml)
**NaNO ₃	50	14.17
	100	13.73
	200	14.91
	400	12.70
	800	12.01
**(NH ₄) ₂ SO ₄	50	13.38
	100	16.57
	200	15.33
	400	14.68
	800	16.70
**Urea	50	12.78
	100	15.87
	200	15.43
	400	15.27
	800	14.15
NaNO ₃	100	15.26
(NH ₄) ₂ SO ₄	100	15.59
Urea	100	16.85

* The amount of NaNO₃ in czapeck-Dox medium is 100%.

** 0.1% Yeast extract is added.

정하였을 때 각 배지에서 96시간 배양된 균체량은 단위 배양액 당 각각 13.35 mg/ml, 15.78 mg/ml, 14.48 mg/ml 및 9.93 mg/ml이었으며 Cassava의 전분을 6% 함유한 배지에서 균체의 생산이 가장 많았다.

또한 검정곰팡이를 진탕배양하여 얻은 균체를 Lowry 방법에 의하여 균체단백량을 측정하였을 때, 배지 중 Cassava의 전분 함량이 4%, 6%, 8% 및 10%인 경우 각 배지에서 96시간 배양된 균체단백의 양은 단위 배양액 당 2.6 mg/ml, 2.7 mg/ml, 2.5 mg/ml 및 1.7 mg/ml로서 Cassava 전분을 6% 함유한 실험구에서 가장 많았다.

Cassava 전분을 6% 함유시킨 배지에서 배양된 균체의 총 단백질량은 4일 동안 매 24시간마다 측정하였을 때 단위 건조중량에 대하여 233.9 µg/mg, 351.4 µg/mg, 254.2 µg/mg 및 171.8 µg/mg이

Table VII. The levels of total carbohydrate in cassava starch.

Cassava conc.	Reduced carbohydrate (mg/ml)
4 %	6.56
6 %	20.74
8 %	24.85
10 %	41.04

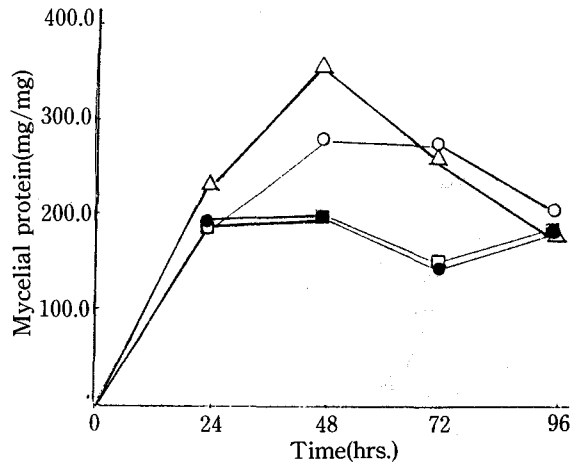


Fig.5. Levels of mycelial protein during fermentation.

○-○ : 4% Cassava starch
 △-△ : 6% Cassava starch
 □-□ : 8% Cassava starch
 ●-● : 10% Cassava starch

었다. 여기에서 48시간 배양된 균체의 총 단백질량이 가장 높은 값을 나타내고 있다. 균체의 총 단백질량은 단위 건조중량에 대하여 평균 252.8 mg/mg으로 균체의 약 25%가 균체단백임을 알 수 있다.

Cassava의 전분분말 중 실제로 함유된 전분의 함량은 79.1~85.8%, 단백질은 1.2~2.5% (金, 1974) 이라고 하므로 Cassava의 전분분말의 함량이 6%인 배지 1 ml에는 47.5~51.5 mg의 전분 및 0.7~1.5 mg의 단백을 함유한다.

Cassava의 전분 함량이 6%인 배지에서 96시간 동안 배양하였을 때의 균체량은 15.78 mg/ml이고 균체단백은 2.7 mg/ml이므로 Cassava의 전분의 이용효율은 33.2~30.7%임을 알 수 있다.

이것은 Robinson and Davidson (Robinson 등, 1950)의 결과보다 50% 낮게 나타났다.

배지 중에 Cassava의 전분의 함량을 6% 함유케

하고 질소원의 종류를 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 Urea로 바꾼 배지에서 배양된 균체생산량을 비교한 바 그 영향에 차이가 없었다.

그러나 NaNO_3 를 질소원으로 사용한 배지의 경우 균체생산량이 6.0 내지 6.7 mg 더 많이 얻어졌다. 이것은 Ghai and Chadal(Ghai 등, 1979)의 연구결과와 부합된다.

Urea를 질소원으로 사용한 배지를 가지고 배양한 경우, Urea 양의 증가에 비례해서 균체생산량이 증가하지 않았다. 이 사실은 5% 이상의 Urea를 공급하였을 때 오히려 성장이 억제되고 Urea의 농도 증가에 비례해서 균체생산이 증가하지 않는다는 Stanton(1969)의 결과와 부합된다.

摘 要

1. Cassava의 전분을 이용하여 검정곰팡이(*Aspergillus niger*)를 30°C에서 4일 동안 진탕배양하였을 때 배지 중 Cassava의 전분의 함량이 4%, 6%, 8% 및 10%일 때 96시간 배양된 각각의 균체량은 13.35 mg/ml, 15.78 mg/ml, 14.48 mg/ml 및 9.93 mg/ml이었다.

2. Cassava의 전분을 이용하여 검정곰팡이를 30°C에서 4일 동안 진탕배양하여 얻어진 균체를 Lowry 방법에 의하여 그 균체단백을 측정할 때 배지 중의 Cassava의 전분의 함량이 4%, 6%, 8% 및 10%일 때 각각의 균체단백은 2.6 mg/ml, 2.7 mg/ml, 2.5 mg/ml 및 1.7 mg/ml이었으며 6% 함유구에서 균체단백의 양이 가장 많았다.

3. 배지 중의 Cassava의 전분량을 6%로 맞추고 질소원의 종류를 NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 Urea를 사용하고 질소량을 Czapeck-Dox 배지에 있는 NaNO_3 의 질소량의 50%, 100%, 200%, 400% 및 800% 되게 변화시키면서 진탕배양한 바 균체생산량에는 차이가 없었다.

參考文獻

Bhattacharjee, J.K.(1970): Microorganisms as

potential sources of food. *Advances in Applied Microbiology*. **12**: 139-161.

Brook, E.J., W.R. Stanton and A. Wallbridge(1969): Fermentation methods for protein enrichment of cassava. *Biotech. and Bioeng.* **11**:1271-1284.

Chada, Y.R.(1970): Sources of starch in Commonwealth territories. III: Cassava. *Tropical science*: 101-113.

Ghai, S.K. and Chahal, D.S.(1979): Note on the effect of nitrogen, pH and incubation period on the production of fungal protein. *J. Res.* **16**: 60-63.

Gray, W.D. and Abou-el-seoud, M.O.(1966-c): Fungal protein for Food and Feeds. II. Whole sweet potato as a substrate. *Economic Botany*. **20**(2): 119-126.

Gray, W.D. and Abou-seoud, M.O.(1966-a): Fungal protein for food and feeds. III. Manioc as a potential crude raw material for tropical areas. *Economic Botany*. **20**(3): 251-255.

Gray, W.D.(1966-b): Fungal protein for Food and Feeds. I. Introduction. **20**, 1, pp.89-93.

Han, Y.W., Dunla, C.E. and Calthan, C.D.(1971): Single cell protein from cellulosic wastes. *Food technology*. **25**: 130-133.

Robinson, R.F. and Davidson, R.S.(1950): The large-scale growth of higher fungi, *Advanced in Applied Microbiol* **1**: 261-278.

Stanton, W.R. and Wallbridge, A.(1969): Fermented food process. *Process Biochemistry*: April, 45-51.

裴 武(1974): 섬유질분해효소의 응용(기술해설), 해외기술정보지 **6**(1): 28~33.

曹哉銑(1975): Tapioca의 특성과 그의 가공. 同德女大 研究論文集.

金鍾協(1974): 菌體蛋白資源(SCP)의 開發方向, 해외기술정보, **6**, 2, pp.107~113. *Korstic*. 서울.

新澤信男(1973): 將來の畜産の方向をさぐる, 飼料飼料工業 第13卷 第10號, 日本, 東京, 日本語版.

Accepted for Publication 2 November 1987