Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 16, No. 2, 105—110 (1988)

전분이용성 세포융합 효모를 이용한 단세포단백질 생산

정건섭*·최신양·구영조·신동화

농수산물유통공사, 종합식품연구원

Production of Single-Cell Protein from Starchy Material by the Fusant

Chung, Kun-Sub,* Shin-Yang Choi, Young-Jo Koo and Dong-Hwa Shin

Food Research Institute/AFMC, Hwasung-kun, Kyonggi-do 445-820, Korea

The production of single cell protein using the amylolytic fusant obtained from cell fusion between *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* was studied. The fusant12 strain was selected for single cell protein production from starchy materials among five fusants. Optimum nitrogen source and its concentration for the growth of fusant12 were ammonium sulfate and 0.1%, respectively. Optimum concentration of soluble starch and optimum pH of the basal medium were 7% and pH 5.6, respectively. Autolysis of fusant12 was effectively carried out by addition of 5% (v/v) ethyl acetate to the cell suspension and liquidization for 30 min before incubation for 24 hr at 30°C. Coculture of fusant12 and non-amylolytic yeast, *Torulopsis candida* YA-15, resulted in the increase of the mass as compared to the monoculture of fusant12. The cell mass on tapioca medium was increased about 2.5 times as on soluble starch medium. The content of crude protein and nucleic acid of the dry cell were 39% and 5.8%, respectively.

단세포단백질은 세균, 효모, 곰팡이 등 여러 미생물을 이용하여 농산폐기물, 석유탄화수소, 섬유소자원 및 전분질 등을 원료로 사용하여 생산을 시도하고 있다. 국내에서도 1970년 석유탄화수소를 이용한 단세포단백질생산연구(1)를 시작으로 그후 많은 연구가 되어 왔다. 단세포단백질을 생산하는 미생물중 세균은 균체회수가 곤란하며, 곰팡이는 탱크배양에 의한 대량생산이 곤란하므로 효모가 널리 이용되고 있는 실정이다. 이러한 단세포단백질생산에서 효모는 일반적으로 단당류, 이당류 등의 저당류만을 이용하므로 전분질과 같은 다당류를 탄소원으로 사용하는 경우에는 별도의 당화과정을 거쳐야하는 불편함이 있다. 따라서 본 연구실에서는 1982년부터 값이 싼 원료가 될 수 있는 전분질의 효율적 이용을 위하여 당화과정을 거치지 않고 직접 단세포단백질을 생산할 수 있는 전분이용성 효모를 분리해왔으며(2), 분리효모의 개량을 목적으로 생육속도는 늦으나 전분질을 이용할 수 있는 *Hansenula anomala*와 생육속도는 빠르나 전분질을 이용할 수 없는 *Saccharomyces cerevisiae*간의 세포융합을 실시하여 전분배지에서 생육이 우수한 융합균주를 얻은 바 있다(3). 본 연구에서는 전분이용성 세포융합균주를 사용하여 단세포단백질생산을 위한 몇가지 조건을 연구 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 전보에서(3, 4) 보고한 *Hansenula anomala* var. *anomala*와 *Saccharomyces cerevisiae*간의 세포융합을 통해 얻어진 전분이용성 융합균주 5주와 본 연구실에 보관중인 전분이용성이 없는 *Candida utilis* ATCC 16321, *Rodotorula gracillis* NRRL-Y-2502, *Saccharomyces cerevisiae* Hakken No.1, *Torulopsis candida* YA-15를 사용하였다. 전분이용성 효모의 배양에는 전분이용성 효모 분리시에 사용한 SMM(2)(soluble starch mineral medium; soluble starch 5%, urea 0.107%, $NaNo_3$

Key words: *Hansenula anomala,* single-cell protein, amylolytic yeast,
*Corresponding author

0.239%, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.73%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, K_2SO_4 0.044%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%), 비전분이용성 효모의 배양에는 YPS(3)(yeast ext.-peptone-soluble starch medium; yeast ext. 1%, peptone 2%, soluble starch 2%)를 사용하였다.

배양방법

미생물배양은 500 m*l* Sakaguchi flask에 배지 100 m*l*을 넣어 30℃에서 진탕배양하였으며 종균은 3%의 접종량으로 접종하여 실험하였다. 비전분이용성 효모는 종균배양액을 살균생리식염수로 2회 세척한 후 hematometer로 균수를 계측한 후 접종하였다.

세포융합균주의 자기소화

효모의 자기소화는 高河 등의 방법(5)을 변형하여 행하였다. 20%(w/v) 효모현탁액을 만든 후 유기용매를 현탁액의 5%(v/v) 되도록 첨가하여 30℃에서 일정시간 액화시킨 다음 효모현탁액과 동량의 1 M 황산암모늄용액을 혼합하여 30℃에서 24 hr. 반응시켰으며, 이때 자기소화 정도는 현탁액을 3,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액의 가용성 단백질을 측정하여 정하였다.

분석방법

건조 균체량은 배양액 10 m*l*를 취해 원심분리한 균체침전물을 살균생리식염수로 2회 반복 세척한 후 18 hr. 동결건조하여 무게를 측정하였다.

가용성 단백질함량은 Lowry 등의 방법(6)으로 측정하였으며 이때 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. 조단백질함량은 micro-Kjeldahl법으로 측정하였다.

핵산함량은 Levine 등의 방법(7)에 따라 측정하였으며, 260 nm에서의 핵산의 흡광계수를 32 m*l*/mg·cm로 가정하여 계산하였다. 필수아미노산 조성은 건조균체를 6N 염산용액으로 질소기체 충진하의 110℃에서 20 hr. 가수분해시킨후 50℃에서 감압농축시킨후 구연산완충액에 희석하여 분석용 시료를 준비하였으며 아미노산 자동분석기(LKB 4151 Alpha Plus)로 분석하였다.

결과 및 고찰

단세포단백질생산을 위한 우수균주를 선정하기 위하여 세포융합균주 5주의 전분배지에서의 생육과 균체의 조단백질함량을 비교해본 결과 fusant 12균주가 전분배지에서 생육이 가장 좋았으며, 균체의 조단백질함량은 큰 차이가 없었으므로 fusant 12균주를 선정하여 이하 실험에 사용하였다.

Fusant 12의 최적 배양조건

질소원별 생육 : Fusant 12균주 배양에 적당한 질소원을 찾기 위하여 7가지의 무기질소원을 사용하여 생육을 비교하였다. 이때 기본배지로 SMM에서 질소원인 요소와 $NaNO_3$를 제외하고 대신 각각의 질소원을 질소함량으로 0.1%되도록 첨가한 배지를 사용해 배양하였다. 그 결과 $(NH_4)_2SO_4$가 가장 좋은 생육을 보였다(Table 1).

질소원농도별 생육 : Fusant 12균주의 생육에 최적인 $(NH_4)_2SO_4$의 농도를 조사하기 위하여 SMM 기본배지에 $(NH_4)_2SO_4$를 0.01~1.0%(w/v) 첨가해 생육을 비교하였다. 그 결과 $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%(w/v) 이상의 농도에서는 균체생육에 큰 영향을 주지 않았다(Table 2). 따라서 이후 실험의 배지에는 $(NH_4)_2SO_4$를 0.1%(w/v) 첨가해 사용하였다.

Soluble starch 농도별 생육 : Fusant 12균주 배양에 적당한 soluble starch의 농도를 조사하기 위하여 $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%(w/v)를 첨가한 SMM에 soluble starch를 1~13%(w/v) 첨가해 생육을 비교하였다. Soluble starch 7%(w/v) 첨가시 균체생육이 가장 좋았으며 그 이상의 농도에서는 균체생육이 억제됨

Table 1. Effect of nitrogen sources on growth of fusant 12.

N-sources*	Initial pH	2 day		4 day		6 day	
		Cell Mass**	pH	Cell Mass	pH	Cell Mass	pH
none	6.4	1.4	6.3	2.6	6.2	2.7	6.0
$(NH_2)_2CO$	6.3	0.7	6.4	2.6	6.1	4.5	6.4
$(NH_4)_2HPO_4$	6.4	0.6	6.1	1.7	6.1	6.6	5.5
$(NH_4)H_2PO_4$	6.4	1.0	6.2	2.6	6.2	4.8	6.0
$(NH_4)_2SO_4$	6.3	3.2	6.4	4.1	6.3	7.5	6.0
$(NH_4)NO_3$	6.4	3.0	6.5	3.9	6.5	6.6	6.3
KNO_3	6.3	0.9	6.5	1.7	6.4	1.4	6.4
$NaNO_3$	6.3	1.1	6.4	2.0	6.3	5.2	6.5

Basal medium; soluble starch 5%, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.73%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, K_2SO_4 0.044%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%

* The nitrogen sources are 0.1% as nitrogen content.

** Unit; dry weight in gram per liter

Table 2. Effect of $(NH_4)_2SO_4$ concentration on growth of fusant 12.

Concentration	Final pH	Cell Mass (g/liter)
0.01 %	6.0	1.9
0.05	6.0	3.0
0.1	5.9	3.5
0.2	5.9	3.5
0.4	5.9	3.5
0.6	5.9	3.5
0.8	5.9	3.5
1.0	5.8	3.5

Basal medium; soluble starch 5%, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.73%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5% K_2SO_4 0.044%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005% (pH 6.4)
The cultivation was done at 30 °C for 4 days aerobically.

을 보였다(Table 3). 이 결과는 C/N비가 100~150 사이에서 fusant 12의 생육이 우수한 반면 그 이상일 때는 질소원보다 상대적으로 많은 탄소원인 탄수화물의 삼투압에 의한 생육저해를 받는 것으로 생각된다. 한편 이 결과는 전분이용성 효모인 *Sporobolomyces holsaticus*의 배양시 C/N비가 100일 때 가장 빠른 비성장속도를 나타냈다는 보고(8)와 유사하다.

배지의 초기pH별 생육 : 배지의 초기pH가 fusant 12균주의 생육에 미치는 영향을 조사하고저, 배지의 pH를 5.4~6.6으로 조정 배양하여 생육을 비교하였다. 최적 초기pH는 5.6~5.8사이임을 알 수 있었다 (Table 4). pH 6.4 이상에서 균체생성량이 증가한

Table 3. Effect of concentration of soluble starch on growth of fusant 12.

Concentration (%)	Final pH	Cell Mass (g/liter)	Cell No. (CFU/ml)
1	5.9	2.2	4.5×10^8
3	5.9	3.7	7.1×10^8
5	5.7	4.8	9.4×10^8
7	5.3	6.6	1.3×10^9
9	5.3	6.6	1.1×10^9
11	5.3	6.1	9.3×10^8
13	5.3	5.1	7.2×10^8

Basal medium; $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.73%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, K_2SO_4 0.44%, $ZnSO_4$ $7H_2O$ 0.005% (pH 6.4)
The cultivation was done at 30 °C for 6 days aerobically.

Table 4. Effect of initial pH of medium on growth of fusant 12.

pH		Cell Mass (g/liter)
Initial	Final	
5.40	4.9	1.9
5.60	5.2	2.9
5.80	5.6	2.9
6.00	5.9	2.3
6.20	6.0	2.1
6.40	6.0	2.5
6.60	6.1	2.7

Basal medium; soluble starch 7%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.73%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, K_2SO_4 0.044%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%
The cultivation was done at 30 °C for 4 days aerobically.

결과는 pH증가에 따라 배지중의 전분 및 기타 성분들이 불용성으로 침전되어서 건조균체시료에 혼입됨에 기인하는 것으로 생각된다.

Fusant 12균체의 자기소화

Fusant 12균체의 단백질 용출 정도를 조사하기 위하여 일반적으로 높은 효율로 추출이 가능한 것으로 알려진 여러가지 유기용매를 이용한 자기소화조건을 검토하였다. 여러가지 유기용매중 ethyl acetate를 이용하였을 때 가장 우수한 추출효과를 보였으며, chloroform의 경우 오히려 저하시키는 경향을 나타냈는데 이는 chloroform에 의한 세포내의 자기소화 효소들의 손상에 기인하는 것으로 생각되었다(Table 5). 자기소화시의 ethyl acetate 첨가량은 5%(v/v) 첨가가 가장 효과적이었으며 그 이상의 농도에서는

Table 5. Effect of organic solvents on the autolysis of fusant 12.

Organic solvent*	Soluble protein** (mg/g dry cell)	Relative yield (%)
None	56.0	100
Ethyl acetate	77.8	139
Toluene	56.6	101
Chloroform	37.0	66
Ethyl alcohol	55.4	99

* The final concentration of organic solvents was 5% (V/V).
** Soluble protein was measured by Lowry-Folin method.

큰 차이를 보이지 않았고, ethyl acetate 첨가후 30분간 액화과정을 거치므로써 액화처리를 행하지 않았을 때보다 1.5배 정도 높은 단백질 용출효과를 나타내었다. 이상의 결과 유기용매를 이용한 자기소화에 의한 가용성 단백질용출은 高河 등(5)의 결과와 유사하였다. 한편 Lee 등(9)은 alcohol과 식염을 이용하여 약 3,000 rpm의 속도로 교반하면서 자기소화를 행한 결과 40% 정도의 조단백질을 회수하였으나 이는 가용성 추출분획을 진공농축한 시료의 조단백질함량으로 표시한 것으므로 본 결과와는 비교할 수 없었다.

Fusant 12균주와 비전분이용성 효모와의 혼합배양

전분질을 이용하여 단세포단백질을 효율적으로 생산하고져 전분이용성 효모로써 전분분해력을 지닌 fusant 12균주와 전분분해력이 없고 저당류만을 자화하는 비전분이용성 효모와의 혼합배양을 실시하였다. 이러한 전분질을 탄소원으로한 혼합배양의 균체생산연구는 Wickerham 등이 *Saccharomycopsis fibuliger*와 *Candida utilis*의 혼합배양으로 단세포단백질 생산을 시도하였고(10), 1960년대 스웨덴에서 이와 유사한 Symba process가 위의 두 균주 혼합배양에 의해 개발되었으며(11), 그 후 1979년 Lemmel 등이 위 두 균주를 이용하여 감자가공폐수에서의 혼합배양에 의한 균체생산을 보고한 바 있다(12). 또한 최근에 Noparatnaraporn 등은 전분이용성 *Rhodocyclus gelatinosus*와 전분이용성은 없으나 비타민 B_{12}와 carotinoid를 많이 생성하는 *Rhodobacter sphaeroides*와의 혼합배양에 의한 균체생산을 보고하고 있다(13).

비전분이용성 효모의 선정 : Fusant 12균주와 혼합배양시 균체생성이 우수한 비전분이용성 효모를 선정하기 위하여 식사료효모로 이용되는 *Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae, Torulopsis candida*와 지방생성효모로 알려진 *Rhodotorula gracilis*를 단독 및 fusant 12균주와 혼합배양하여 균체생성량을 비교하였다. 그 결과 균체생성은 fusant 12균주와 *T. candida*의 혼합배양시 가장 많았으며(Table 6), *R. gracilis*, *S. cerevisiae*의 혼합배양은 fusant 12균주 단독배양보다 균체생성이 적었는데 이는 이들 균주가 지방 및 alcohol과 같은 대사산물을 생성 축적하는데 energy를 소비하기 때문으로 사료된다.

혼합균주 접종비별 균체생성 : 혼합배양시 전분이용성 효모와 비전분이용성 효모와의 접종비에 따른

Table 6. Comparison of the cell mass in monocultures and cocultures of non-amylolytic yeast and fusant 12.

Yeast	Fusant 12	Cell Mass (g/liter)
Candida utilis ATCC 16321	−	2.3
Candida utilis ATCC 16321	+	4.5
Rodotorula gracillis NRRL-Y-2502	−	2.5
Rodotorula gracillis NRRL-Y-2502	+	3.2
Saccharomyces cerevisiae Hakken No.1	−	2.1
Saccharomyces cerevisiae Hakken No.1	+	3.9
Torulopsis candida YA-15	−	2.2
Torulopsis candida YA-15	+	4.5
none	+	4.1

Basal medium; soluble starch 7%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.73%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, K_2SO_4 0.044%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005% (pH 5.6)
The cultivation was done at 30 °C for 6 days aerobically.

균체생성을 비교하기 위하여 fusant 12균주와 *T. candida*의 접종비를 변화시켜 배양하였다. 접종비가 6대4일 때 가장 높은 균체생성을 보였으며, 비전분이용성 효모를 전분이용성 효모보다 많이 접종하면 균체생성량이 저하됨을 알 수 있었다(Table 7). 이러한 결과는 Noparatnaraporn 등의 연구에서 비전분이용성 효모인 *Rb. sphaeroides*를 전분이용성 효모인 *Rc. gelatinosus*보다 많이 접종하였을 때 비성장속도가 낮아지는 결과와 Mheen 등의 석유탄화수소 자화성 효모와 ethanol 자화성 효모의 혼합배양연구에서 탄화수소자화성 효모가 더 많이 혼합될 때 균체생성

Table 7. Effect of inoculum ratio on the cell mass by coculture of fusant 12 and *Torulopsis candida* YA-15.

Inoculum Ratio(%)		Final pH	Cell Mass (g/liter)	Cell No. (CFU/ml)
Fusant 12	*T. candida*			
1	0	3.2	5.4	8.38×10^8
0.8	0.2	3.1	6.0	1.16×10^9
0.6	0.4	3.2	6.2	1.50×10^9
0.5	0.5	3.2	5.8	1.09×10^9
0.4	0.6	3.3	5.2	8.16×10^8
0.2	0.8	3.3	4.7	7.60×10^8
0	1	5.2	1.5	1.02×10^8

Basal medium; soluble starch 7%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.72% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, K_2SO_4 0.044%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005% (pH 5.6)
The cultivation was done at 30 °C for 6 days aerobically.

량이 높은 결과(14)와 유사한 현상으로 사료된다.

Tapioca 전분을 이용한 균체생성

단세포단백질 생산의 원료는 가격이 저렴한 것이어야 한다. 따라서 전분질원료중 값싼 tapioca를 탄소원으로 이용할 수 있는 가능성을 조사하고저 tapioca 분말을 호화시킨 수용성 분획(TM; tapioca medium)과 이 수용성 분획에 $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.73%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, K_2SO_4 0.044%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%를 첨가한 TMM(tapioca mineral medium, pH 5.6)에 배양하여 균체생성을 비교하였다. 그 결과 TM 및 TMM상에서 SMM에서 보다 많은 균체생성량을 보였으며, 특히 TMM상에서는 SMM에서 보다 단독 및 혼합배양

Table 8. Effect of the various media on cell mass by monoculture and coculture.

Medium		Final pH (g/liter)	Cell Mass
SMM	monoculture	3.8	5.5
	coculture	3.8	6.0
TM	monoculture	7.2	7.2
	coculture	7.2	9.0
TMM	monoculture	3.3	13.1
	coculture	3.2	16.6

SMM; soluble starch mineral medium
TM; tapioca medium (After 7% tapioca solution was gelatinized at 95°C for 10 min, and then centrifuge it at 5.000 rpm for 15 min. The TM consist of the supernatant only.)
TMM; tapioca mineral medium (The TMM consist of the gelatinized supernatant of tapioca solution and nitrogen and mineral sources as SMM.)
The cultivation was done at 30°C for 6 days aerobically.

Table 9. Comparison of crude protein and nucleic acid content of the cells.

(unit: % dry cell weight)

Strain	Crude Protein	Nucleic Acid	Reference
Fusant 12	39.3	5.8	this work
Fusant 12 & *Torulopsis candida* YA-15	38.8	5.7	this work
Hansenula polymorpha DL-1	46	5.0-7.0	Levine & Cooney[7]
Sporobolomyces holsaticus FRI-Y-5	45.6	7.6	Park *et al.*[16]

모두 2.5배 정도의 균체생성량이 증가되었다(Table 8). Park 등(15)은 tapioca의 화학적 성분을 전분 69.1%, 수분 12.47%, 환원당 4.9%, 회분 3.12%, 총질소 0.19% 등으로 보고하였다. Tapioca 배지에서 균체생성이 크게 증가한 결과는 tapioca중의 환원당 및 기타 유기화합물과 회분 등의 복합적 성분들이 균체생육에 영향을 미친 것으로 생각된다.

균체 성분분석

배양한 균체의 몇가지 성분을 조사한 결과 조단백질함량은 39%, 핵산함량은 5.8%로 다른 효모단세포단백질보다 조금 낮은 편이었다(Table 9). 균체단백질의 필수아미노산 조성은 FAO 표준단백질과 비교하여 methionine이 낮은 편인데 이는 미생물단세포단백질의 공통된 현상이며, 한편 일반적으로 식물성 단백질에 부족한 lysine은 8.6g/100g protein으로 밀가루단백질의 1.9, 대두단백질의 6.2g/100g protein(16)보다 많이 함유하고 있었다(Table 10).

Table 10. Comparison of essential amino acids in the cell.

(Unit: g amino acid/100 g protein)

Amino Acid	FAO Reference	Fusant 12	Fusant 12 & *Torulopsis candida* YA15	*Hansenula polymorpha* DL-1[7]	*Sporobolomyces holsaticus* FRI-Y-5[16]
Leucine	4.8	7.00	7.04	8.34	7.50
Isoleucine	4.2	5.08	4.39	5.10	3.66
Lysine	4.2	8.62	8.10	8.10	6.12
Valine	4.2	4.91	4.25	6.21	4.47
Phenylalanine	2.8	4.01	3.84	4.96	3.55
Threonine	2.8	3.44	2.90	5.17	3.86
Methionine	2.2	0.19	0.17	1.45	1.27
Tryptophan	1.4	—	—	—	2.11

요 약

전분이용성 세포융합 효모를 이용하여 단세포단백질 생산을 위한 기초실험을 행하였다. 전분배지에서 균체생성이 우수한 fusant 12균주의 배양조건은 최적 질소원 $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, 최적 soluble starch 농도 7%, 최적 초기pH 5.6이었다. Fusant 12균체의 자기소화에 의한 가용성 단백질의 추출은 효모현탁액에 ethyl acetate를 5%(v/v)되게 첨가하여 30 min간 액화전처리과정을 행하므로 효과적으로 얻을 수 있었다. 전분이용성 효모인 fusant 12균주와 비전분이용성 효모인 *Torulopsis candida*의 혼합배양으로 균체생성량을 증가시킬 수 있었으며, 혼합배양시 종균접종혼합비는 6대4일 때 효과적이었다. Fusant 12균주 단독 및 *Torulopsis candida*와의 혼합배양시 tapioca 배지에서의 균체생성량은 soluble starch 배지에서 보다 약 2.5배 증가하였다. 건조균체의 조단백질함량은 39%, 핵산함량은 5.8%이고 균체단백질은 FAO 표준단백질과 비교하여 필수아미노산중 methionine 함량이 낮으며, lysine 함량은 높았다.

참고문헌

1. Kwon, T.W., T.I. Mheen, Y. Park and Y.R. Pyun; *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **2**, 56-60 (1970).
2. Park, W.S., Y.J. Koo, D.H. Shin and K.B. Suh; *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **15**, 46-50 (1983)
3. Chung, K.S., Y.J. Koo and D.H. Shin; *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 145-149 (1987).
4. Choi, E.H., W.C. Chung and E.Y. Chung; *Annual Report of Food Research Institute*, **13**, 101-108 (1986).
5. 高河原勇, 藤田剛, 鈴木康生, 山內惇一, 藤井克美, 山下仁平, 堀尾武一; 發酵と工業, **35**, 737-760(1978).
6. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randal; *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
7. Levine, D.W. and C.L. Cooney; *Appl. Microbiol.*, **26**, 982-990 (1973).
8. Park, W.S., Y.J. Koo, D.H. Shin and B.Y. Min; *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **15**, 56-61 (1983).
9. Lee, C.H., C.R. Park and K.S. Chung; *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **13**, 181-187 (1981).
10. Wickerham, L.J. and C.C. Kuehner; U.S. patent, 2,764,487, September (1956).
11. Jarl, K.; *Food Technol.*, **23**, 1009-1012 (1969).
12. Lemmel, S.A., R.C. Heimsch and L.L. Edwards; *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 227-232 (1979).
13. Noparatnaraporn, N., S. Trakulnaleumsai, R.G. Silveira, Y. Nishizawa and S. Nagai; *J. Ferment. Technol.*, **45**, 11-16 (1987).
14. Mheen, T.I., Y.R. Ryun and T.W. Kwon; *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **6**, 219-230 (1974).
15. Park, W.S., Y.J. Koo, D.H. Shin and B.Y. Min; *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **15**, 177-182 (1983).
16. Park, W.S., Y.J. Koo, D.H. Shin and K.B. Suh; *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **15**, 170-176 (1983).

(Received February 22, 1988)