

에탄올 생산성 향상을 위한 Alginate-Celite 고정화 방법의 개발

†김 승 옥 · *김 은 영 · *홍 영 기
고려대학교 화학공학과, *수원대학교 유전공학과

Development of Alginate-Celite Immobilization Technique for the Improvement of Ethanol Productivity

Seung Wook Kim[†], Eun Young Kim^{*}, and Young Gi Hong^{*}

Dept. of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*Dept. of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon P. O. Box 77, Suwon 445-743, Korea

ABSTRACT

The optimal initial pH for the ethanol production by *Saccharomyces* K35 was found to be 5.0, and about 80% of yield was obtained when 200g/ℓ of glucose was used as a substrate, which showed sugar tolerant. As the additives and cross-linking agent, the addition of 1.67% (w/v) Celite R-634 together with 0.33% (v/v) of glutaraldehyde (ACG bead) resulted in better stability, ethanol productivity and cell viability than Ca-alginate bead. Also, ACG bead seemed to be more resistant to phosphate ion than Ca-alginate bead, considering outgrowing cell concentration in the media. Scanning electron microscopic observation depicted that the surface of ACG bead was almost similar to the original state but not for Ca-alginate bead. When repeated-batch culture was performed with Ca-alginate bead for 60 days in a 500ml Erlenmeyer flask, ethanol and cell concentration were maintained about 138g/ℓ -gel and 29 ~ 30g/ℓ -gel, respectively, up to 40 days (7th run number), and then both were rapidly decreased. In the case of ACG bead, ethanol and cell concentration were maintained about 130~150g/ℓ -gel and 32 ~ 35g/ℓ -gel, respectively, up to 60days (10th run number). Cell viability was maintained about 70%, and outgrowing cell concentration was below 5.8% of total cell concentration.

서 론

에탄올 발효에서 생산성을 높이기 위해 많은 연구가 진행되고 있으며, 이를 위해 적합한 생산공정을 개발해야 한다. 특히 산업적인 에탄올 생산공정에서 우수한 발효균주의 사용은 매우 중요하고, 일반적으로 많이 사용되는 균주로서는 *Saccharomyces*

cerevisiae, *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces* 등의 효모가 있다. 에탄올 발효에서 효모는 생성된 에탄올에 의해 세포의 성장과 에탄올 생산이 억제되어 세포 생존률에 영향을 미친다. 에탄올 내성은 발효속도 및 당내성과 함께 중요한 요소이며 발효조건에 의해 달라질 수 있다(1, 2). 효모는 이러한 요소들에 대해 매우 안정한 편이지만 효모의 종류에 따라 상당히 다르므로 에탄올 내성, 당 내성, 발효속도 등을 고려함으로써 우수한 효모를 선택하여 적합한 생산

† Corresponding Author

공정에 의해 조업하는 것이 필요하다.

에탄올 생산성을 증가시키는 방법중 가장 많은 관심을 끌고 있는 기술은 균체 고정화를 이용한 발효 방법으로 세포의 활성을 안정화시키고 경제적으로 활용하는 기술분야에 관한 연구가 발전되면서 고정화 기술에 대한 연구가 활발해졌다(3, 4). 이 중 에탄올 생산공정에서는 대량으로 손쉽게 구할 수 있고, 고정화 과정이 저렴하고, 장기간동안 기계적 강도가 우수하며 무독성의 천연 고분자인 Calcium-alginate를 이용한 포괄법이 가장 많이 사용되고 있다. 이 방법의 주된 단점은 phosphate와 같은 calcium-chelating agent의 존재하에 calcium-alginate gel이 쉽게 파괴될 수 있다는 점이다(5). 발효배지의 phosphate는 발효균주의 정상적인 기능을 유지하는데 필수적인 요소이므로, phosphate에 안정하여 기계적 강도가 우수하고 장기간 사용할 수 있으며 고농도의 세포를 유지하고 누출되는 세포의 수가 적으며 세포생존력이 좋고, 특히 에탄올을 정상적으로 생산할 수 있어야 할 것이다.

송(6)은 *Saccharomyces* K35가 에탄올 내성 및 고온 내성이 우수한 효모라고 보고한 바 있으며, 김 등(7)은 이 효모를 다양한 alginate bead에 고정화하여 생산성을 높인 바 있는데, 본 연구에서는 *Saccharomyces* K35를 이용하여 기본적인 발효특성을 알아보고, 기존의 alginate gel 고정화 방법을 개발하여 에탄올 생산성을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

수원대학교 유전공학 연구소에서 보관중인 에탄올 생산 우수효모균주인 *Saccharomyces* K35를 Malt extract agar 배지에서 30°C에 2일간 배양시킨후 4°C에서 보관하였다.

배지 및 발효

종균 배지는 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose를 사용하였고 30°C의 rotary shaking incubator에서 1일간 배양시킨후 접종액으로 사용하였다. 에탄올 생산배지로 5% dextrose, 0.25% yeast extract, 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% Na₂HPO₄, 0.01% MgSO₄, 0.0001% FeSO₄를 사용하였고 배양배지의 초기 pH를 조절하기 위하여 멸균전에 pH를 0.1N HCl이나 0.1N NaOH를 사용하였다.

회분식 발효는 100ml 종균배지 또는 생산배지를

포함한 250ml Erlenmeyer플라스크에서, 반복회분식 발효는 생산 배지 200ml를 포함한 500ml Erlenmeyer플라스크에서 혐기성, 정치배양을 하였다. 생산배지는 6일마다 교환하였고, 3일마다 시료를 채취하여 분석하였다.

Alginate에 의한 고정화 방법

Na-alginate(high viscosity, Sigma chemical Co.)를 적당한 농도로 증류수에 넣어 magnetic stirrer로 녹인 후 121°C, 15기압에서 멸균하여 만든후 같은 부피의 균체 현탁액을 잘 섞은 후, peristaltic pump를 사용하여 주사바늘(18~22gauge)을 통해 경화 용액에 떨어뜨려 직경이 2~3mm의 bead를 제조 하였다. Bead의 완전한 겔화를 위해 4°C에서 12시간동안 경화용액에 보관하였다. 첨가제나 가교제를 혼합하는 경우에는 30ml의 2%(w/v) alginate에 mesh size가 50/100인 Celite(R-634) 1.67%(w/v)와 glutaraldehyde 0.33%(w/v)를 첨가하여 bead를 제조하였다.

SEM(Scanning Electron Microscopy)에 의한 관찰

발효전 또는 발효후에 시료를 채취하여 담체의 표면과 단면을 관찰하기 위해 전처리를 하였다. 전처리는 2.5% glutaraldehyde용액이 포함된 cacodylate buffer(pH 7.2) 또는 Tris buffer(pH 7.2)에 1시간동안 4°C에서 고정시킨후 cacodylate 또는 Tris buffer(pH 7.2)로 30분동안 4°C에서 담그어 세척을 한다. 에탄올 농도를 10~100%로 단계적으로 높여가며 탈수시켜 acetone으로 처리후 amylacetate를 30분간격으로 2번 처리하여 CO₂ 감압하의 31°C critical point dryer에서 건조한 후 금으로 coating하여 Scanning Electron Microscope(Model No. JSM 35CF-JSM 5300, Zol)로 관찰하였다.

분석 방법

Glucose의 농도는 발효액을 원심분리시켜 얻은 상등액을 DNS 방법(8)을 이용하여 분광광도계(Hitachi U-100, Japan)로 575nm에서 흡광도를 측정하여 얻었다. 생산된 에탄올은 Bernet와 Gutman(9)의 방법을 이용하여 효소적으로 정량하였으며 340nm에서 흡광도를 측정하여 에탄올을 정량하였다. 세포생존률은 methylene blue staining법(10)을 이용하여 측정하였고, 균체수는 발효액을 일정량 희석한 후 haemocytometer를 사용하여 계산하였으며, 균체량은 분광광도계로 570nm에서 측정

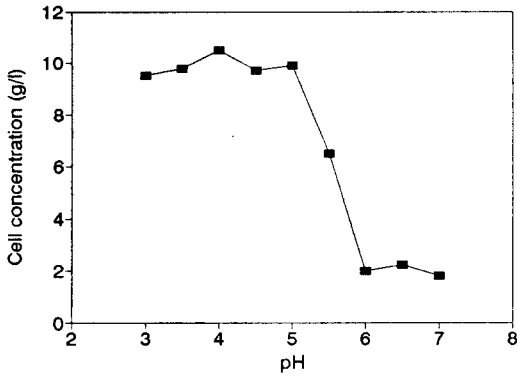


Fig. 1. Effect of initial pH on cell concentration.

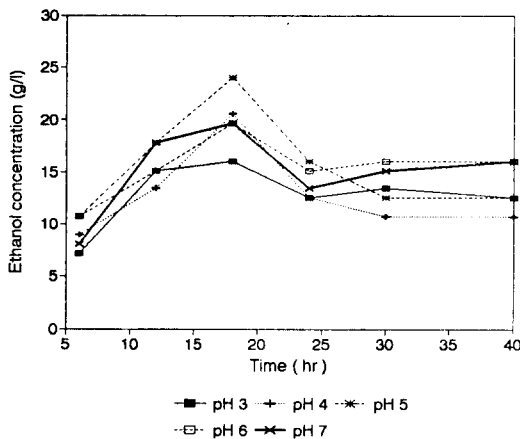


Fig. 2. Effect of initial pH on ethanol production.

하여 calibration curve에 의해 환산하여 건조중량을 얻었다. Gel내의 균체수와 균체농도는 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 후 앞의 방법과 같이 측정하였다.

결과 및 고찰

초기 pH의 영향

효모를 이용한 에탄올 발효에서 발효배지의 pH가 에탄올 생산성에 중요한 영향을 미친다고 보고되어 있다(11). 에탄올 생산배지에서 초기 pH에 따른 효모의 농도, 에탄올의 생산 및 효모의 생존률을 살펴 보았다. 효모의 농도는 Fig. 1에서 보여주듯이 pH 3~pH 5에서 비슷하였지만 pH 4에서 10.7g/l로 가장 높았고, pH 5.5이상에서 급격히 감소함을 보여준다. 에탄올 농도는 각각의 pH 범위에서 약 17

Table 1. Effect of initial pH on cell viability.

Time(hr)	% of cell viability at given initial pH				
	3	4	5	6	7
0	90.7	94.0	92.0	92.0	90.0
24	87.1	93.0	91.3	90.8	92.3
48	88.0	95.0	90.2	90.0	90.0
72	85.7	88.0	89.0	88.0	87.6
96	84.0	87.0	85.4	86.0	86.6
144	83.0	85.8	84.8	85.5	88.8
192	81.2	84.7	83.0	82.5	82.0
240	78.2	80.1	83.0	81.0	80.0
Average	84.7	88.4	87.0	86.9	87.1

Culture was carried at 30°C for 10days in the production medium containing 5%(w/v) glucose, 0.25%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) (NH₄)₂SO₄, 0.1%(w/v) Na₂HPO₄, 0.01%(w/v) MgSO₄, 0.001%(w/v) FeSO₄.

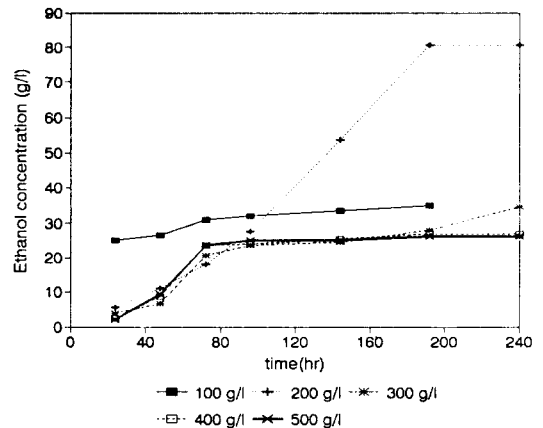


Fig. 3. Effect of glucose concentration on ethanol production.

시간만에 최대의 에탄올 생산을 보였고 pH 5에서 24g/l로 가장 높은 농도를 보였으며, pH 5~pH 7 사이에서는 약 20g/l, 그리고 pH 3에서 가장 낮았다(Fig. 2). pH 3에서 다른 pH에 비해 상대적으로 생산된 에탄올의 농도가 낮은 것은 생존률때문인 것으로 사료된다. 효모의 생존률은 실험한 pH범위에서 72시간까지 거의 모두 85% 이상을 나타냈고, 240시간에서도 pH 3의 경우를 제외하고는 80% 이상을 유지하였다(Table 1).

Glucose 농도의 영향

Fig. 3과 Fig. 4는 glucose의 농도에 따른 에탄올

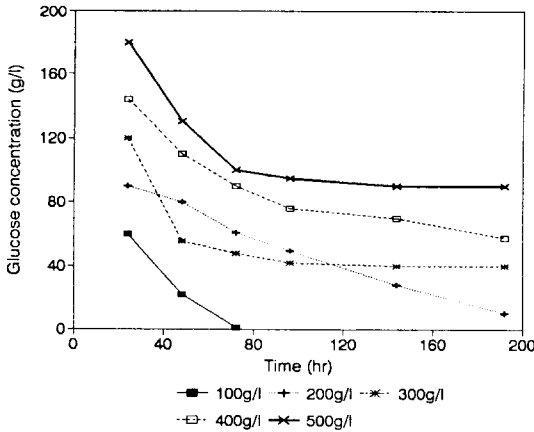


Fig. 4. Effect of initial glucose concentration on glucose consumption.

Table 2. Effect of initial glucose concentration on cell viability.

Time(hr)	% of cell viability at concentration of glucose (g/l)				
	100	200	300	400	500
0	78.9	76.9	85.7	73.7	75.0
24	92.2	87.0	88.3	83.8	92.3
48	90.0	87.9	76.2	81.0	70.0
72	86.7	81.4	80.5	86.4	74.5
96	84.6	82.4	81.4	84.0	76.6
144	—	91.8	82.8	85.5	78.8
192	—	83.7	81.8	72.2	69.0
Average	86.5	84.4	82.4	80.9	76.6

Culture was carried at 30°C for 9days in the production medium containing different concentration of glucose, 1.5%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone.

의 생산과 glucose의 소모량을 보여준다. Glucose의 농도를 100g/l~500g/l로 변화시켰을때 200g/l의 농도에서 96시간이 지나면서 다른 농도에 비해 가장 높은 81g/l의 에탄올이 생산되었다. 이는 약 80%의 수율을 나타내어 내당성도 좋은 것으로 나타났다. Glucose의 농도가 100g/l일때 24시간에 약 25g/l의 에탄올이 생산되었고, 시간이 지남에 따라 35g/l로 거의 비슷한 수준을 유지하였다. 그 밖에 300g/l 이상의 glucose농도에서는 기질 저해 작용을 받는 것을 알 수 있었다. Glucose의 소모량은 초기 glucose농도가 100g/l의 경우 72시간만에 완전히 소모되었고, 200g/l의 경우 시간이 지남에

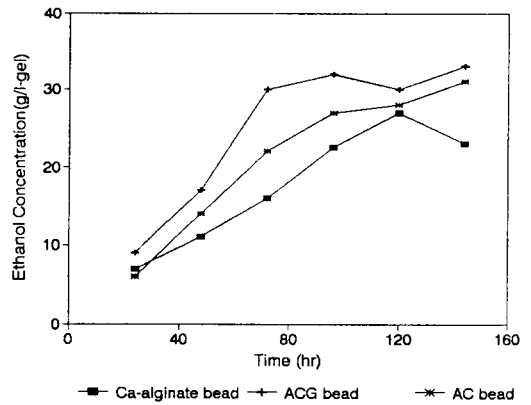


Fig. 5. Effect of different gel beads on ethanol production.

따라 점차적으로 감소하여 192시간에 약 10g/l까지 소모되었고, 300~400g/l의 경우는 상당한 농도의 glucose가 소모되지 않음을 보여주었다.

Table 2는 glucose의 농도에 따른 효모의 생존률을 보여주는데 glucose의 농도가 높아짐에 따라 평균 생존률이 점차 낮아졌다. 100g/l와 200g/l의 glucose를 사용했을때 84% 이상의 좋은 생존률을 보여주었고, 특히 500g/l의 경우는 24시간째의 92.3%를 제외하고는 80%이하의 생존률을 보여 당의 일정 농도이상에서는 생존률에 상당히 영향을 받는 것을 알 수 있다.

고정화 *Saccharomyces* K35에 의한 회분식 배양

Mesh size가 50/100인 Celite R-634를 Alginate에 첨가한 AC(2%(w/v) alginate+1.67%(w/v) Celite R-634) bead와 여기에 glutaraldehyde를 첨가한 ACG(2%(w/v) alginate+1.67%(w/v) Celite R-634+0.33%(w/v) glutaraldehyde) bead를 이용해 회분식 배양을 하여 Ca-alginate에 의한 에탄올 발효와 비교하였다. 첨가제와 가교제의 농도는 전보(7)에서 효과가 가장 좋았던 농도를 이용하였다.

Fig. 5에서 보는바와 같이 ACG bead의 경우가 72시간에 약 30g/l-gel로 가장 많은 에탄올을 생산하였으며, AC bead도 Ca-alginate bead보다 더 효율적임을 알 수 있었다. 효모의 농도는 세 경우 모두 거의 비슷하게 나타났다(Table 3). 또한 bead밖에서 성장한 효모의 농도를 보면 Ca-alginate bead의 경우가 가장 높았고, AC bead와 ACG bead의

Table 3. Effect of different immobilization methods on cell concentration.

Day	Cell concentration(g/ℓ)		
	Ca-alginate bead	AC bead*	ACG bead**
1	31.4	28.9	30.2
2	30.0	30.5	29.4
3	29.4	28.6	32.0
4	28.0	28.3	26.3
5	29.6	29.5	28.8
6	28.3	28.6	29.3

* AC : 2%(w/v) Ca-alginate + 1.67%(w/v) Celite R-634

** ACG : 2%(w/v) Ca-alginate + 1.67%(w/v) Celite R-634 + 0.33%(v/v) glutaraldehyde

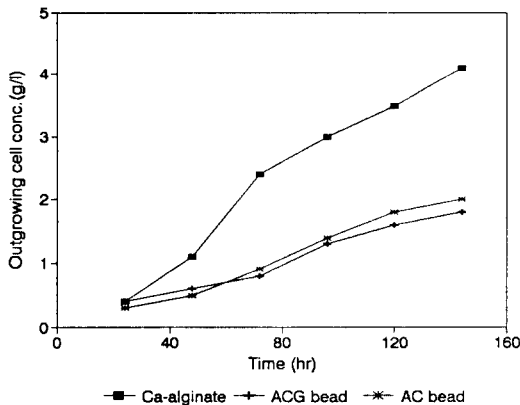


Fig. 6. Effect of different gel beads on outgrowing cell concentration.

경우는 거의 비슷한 수준을 유지했다(Fig. 6). 효모의 생존률은 Table 4에서 보여주듯이 평균 생존률의 경우 ACG bead에서 88.6%로 가장 높게 나타났다.

이러한 결과로부터 Ca-alginate에 Celite를 첨가함으로써 에탄올을 더 효율적으로 생산할 수 있었으며, 특히 AC bead에 glutaraldehyde를 첨가함으로써 에탄올 생산성과 생존률을 증가시킬 수 있었으며, outgrowing cell의 농도도 상당히 감소시킬 수 있었다.

Fig. 7은 Ca-alginate bead와 ACG(2%(w/v) Ca-alginate + 1.67%(w/v) Celite R-634 + 0.33%(v/v) glutaraldehyde) bead의 안정성을 알아보기 위해 일정한 농도의 효모를 고정화하여 0.05M phosphate buffer에 넣어 일정시간동안 rotary shaking incubator(30℃, 100rpm)에서 유지시켰을

Table 4. Effect of different immobilization methods on cell viability.

Day	Cell viability(%)		
	Ca-alginate bead	AC bead*	ACG bead**
1	97	96	96
2	90	92	92
3	86	84	90
4	80	84	90
5	76	80	84
6	76	78	80
Average	84.1	85.1	88.6

* AC : 2%(w/v) alginate + 1.67%(w/v) Celite R-634

** ACG : 2%(w/v) alginate + 1.67%(w/v) Celite R-634 + 0.33%(v/v) glutaraldehyde

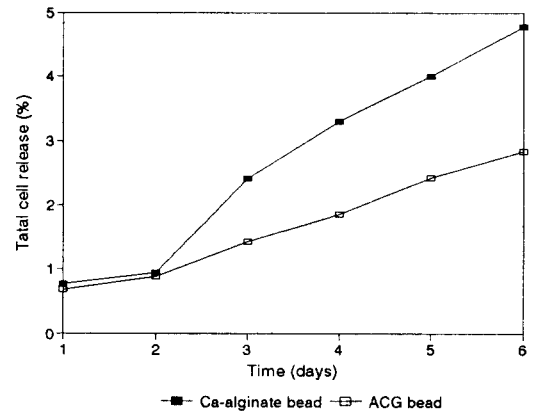


Fig. 7. Total cell release(in percent of cells initially immobilized) from Ca-alginate and ACG bead in 0.05M phosphate buffer.

때에 bead밖으로 유출되는 정도에 의해 bead의 안정성을 보여준다. 효모의 유출정도를 비교해보면 ACG bead가 Ca-alginate bead에 비해 훨씬 우수하였다. 2일째 까지는 유출정도가 두 경우 10% 이내의 수준을 나타냈으나, 3일째부터 약 40% 정도의 차이를 나타내었다. 이러한 결과로 볼때 ACG bead가 Ca-alginate bead에 비해 강도가 높아짐을 알 수 있었다.

고정화 *Saccharomyces* K35에 의한 반복회분식 배양 에탄올 생산성 및 세포생존률이 우수한 것으로 나타난 *Saccharomyces* K35를 Ca-alginate bead와 ACG bead에 고정화하여 반복 회분식 배양을 시도 하였다.

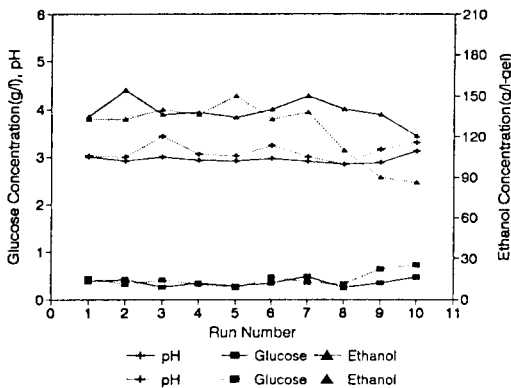


Fig. 8. Repeated-batch culture with ACG gel bead (solid line) and Ca-alginate gel bead (dotted line) for ethanol production.

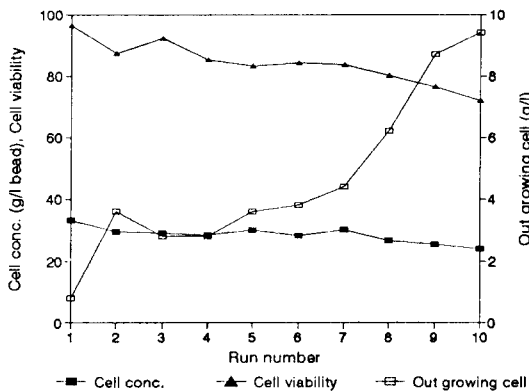


Fig. 9. Cell concentration, cell viability, and outgrowing cell concentration during repeated-batch culture with 2% Ca-alginate gel bead.

Ca-alginate bead에 의한 반복회분식 배양의 결과를 Fig. 8과 Fig. 9에서 보여준다. 에탄올의 생산은 7회분(약 40일)까지는 약 138g/l-gel의 수준을 유지하다가 점차적으로 감소됨을 볼 수 있다. 이는 에탄올 생산배지내에 포함되어 있는 phosphate 이온으로 인하여 bead가 약해지므로 시간이 지남에 따라 bead밖으로 효모가 유출되어 bead내의 효모농도가 감소되어 생기는 현상으로 추측된다. 그리고 7회분 이후부터는 29~30g/l-gel을 유지하던 bead내의 효모농도가 24~25g/l-gel로 감소되는 것과 Fig. 9에서 보여주는 것 같이 세포생존률이 떨어지는

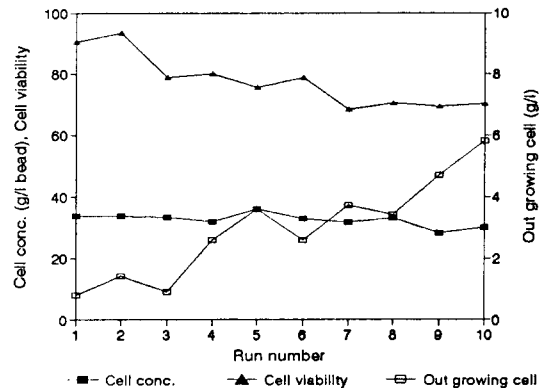


Fig. 10. Cell concentration, cell viability, and outgrowing cell concentration during repeated-batch culture with ACG gel bead.

것을 알 수 있다. 또한 Ca-alginate bead가 배양시간이 길어질수록 부풀고 약해지는 현상과 더불어 bead밖에서 성장한 효모농도가 증가되는 것을 보여준다. 이러한 단점을 보완하고 에탄올 생산을 향상시킬 수 있는 방법을 모색하는 것이 필요하다고 생각되었다. 그래서 앞의 회분식 배양에서 우수한 것으로 나타난 ACG bead를 이용하여 반복 회분식 배양을 수행함으로써 기존의 Ca-alginate bead를 대체할 수 있는 담체로 사용할 수 있는 가능성을 검토해 보았다.

이 ACG bead를 이용하여 반복회분식 배양을 시도하였는데 그 결과는 Fig. 8과 Fig. 10에서 보여준다. 생산된 에탄올 농도는 Ca-alginate bead의 경우와 거의 비슷하게 130~150g/l-gel 수준을 나타냈으며, bead가 더 오래 안정되게 유지되었고 효모의 농도는 Ca-alginate bead 보다 높은 32~35g/l-gel의 수준을 유지하였다. 세포생존률은 약 70% 이상을 유지하였으며, bead외부에서 성장한 효모의 농도는 Fig. 10에서 보여주듯이 Ca-alginate bead의 경우에 비해 훨씬 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 Fig. 7에서 보여준 경향과 일치함을 알 수 있다. 결과적으로 첨가제와 가교제로서 Celite R-634와 glutaraldehyde를 Alginate에 첨가하여 bead를 만들었을 때 Ca-alginate에 비해 에탄올 생산에 더 효율적인 담체라는 것을 알 수 있다.

SEM에 의한 Ca-alginate 및 ACG bead의 관찰
Fig. 11은 Ca-alginate bead의 발효전과 발효후

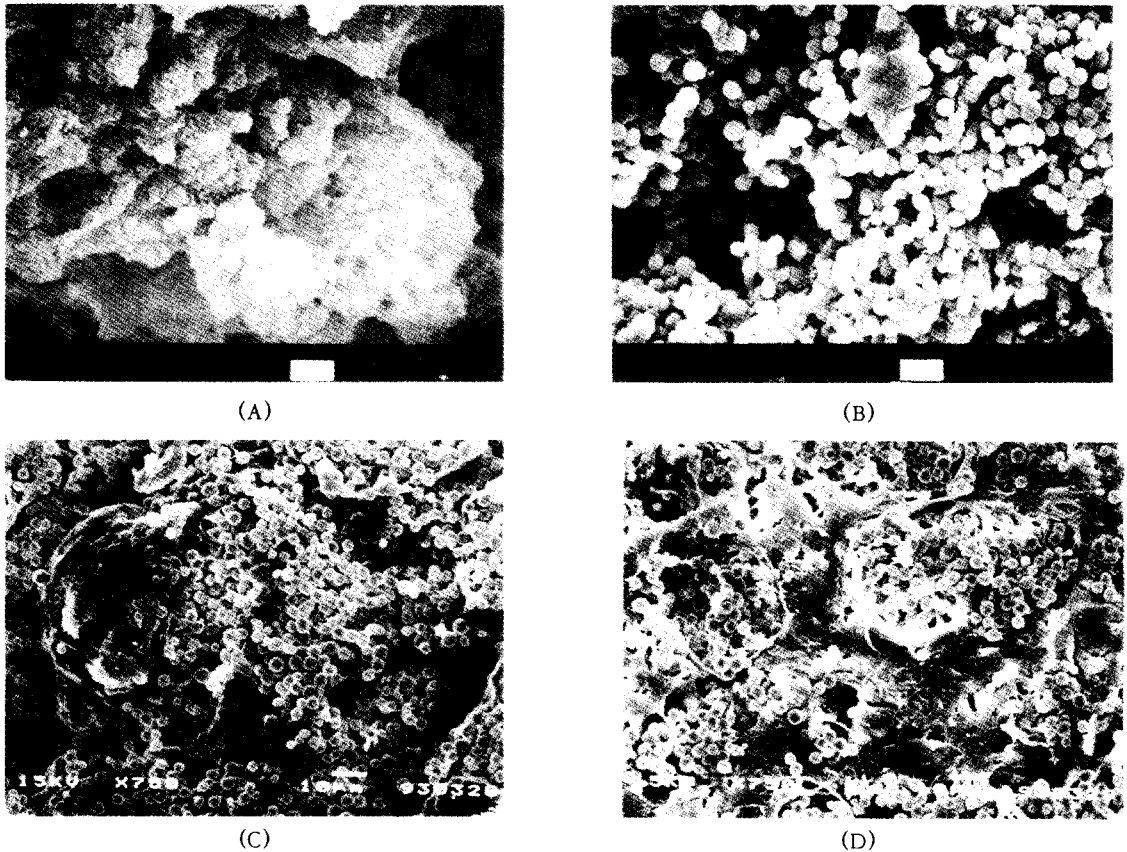


Fig. 11. Scanning electron microphotograph of immobilized cells of K35:(A) Gel surface in Ca-alginate gel bead before incubation, (B) Internal surface in Ca-alginate gel bead before incubation, (C) Gel surface in Ca-alginate gel bead after 15days incubation, (D) Internal surface in Ca-alginate gel bead after 15days incubation.

의 고정화된 효모를 보여준다. (A), (B)는 발효전 외부 및 내부면으로 bead표면에 작은 pore가 명확히 나타나 보이고, bead 내부에는 효모들이 모여 있는 것을 볼수 있다. (C), (D)는 15일 배양후의 모습으로 발효전보다 bead 표면이 많이 파괴된 것을 볼수 있고, 내부의 효모들이 많이 성장하여 밀집되어 있다. Fig. 12는 ACG bead의 발효전과 발효후 고정화된 효모를 보여주는데, (A)와 (B)는 발효전 외부 및 내부면으로 Ca-alginate bead보다 훨씬 조밀한 pore를 이루고 있음을 보여주며, (C)와 (D)는 21일 배양후의 외부와 내부 모습으로 Ca-alginate bead에 비해 온전한 모습을 유지하며, 효모의 농도가 상당히 밀집되고 Celite가 효모들 사이에 박혀있는 것을 알 수 있다.

요 약

에탄올 생산 효모균주인 *Saccharomyces* K35의 에탄올 생산을 위한 최적의 초기 pH는 5.0으로 나타났다으며, 기질로 200g/l의 glucose를 이용했을때 약 80%의 수율을 나타내어 내당성도 좋은 것으로 나타났다. 첨가제와 가교제로서 Celite R-634 1.67% (w/v)와 glutaraldehyde 1.67% (v/v)를 함께 첨가했을때(ACG bead) Ca-alginate bead에 비해 안정성, 에탄올 생산성 및 세포생존률이 좋게 나타났다. 또한 배지밖에서 자란 효모 농도도 감소하여 ACG bead가 Ca-alginate bead보다 phosphate이온에 더 안정한 것으로 보인다. SEM(Scanning Electron Microscopy)을 통해 ACG gel bead의 구

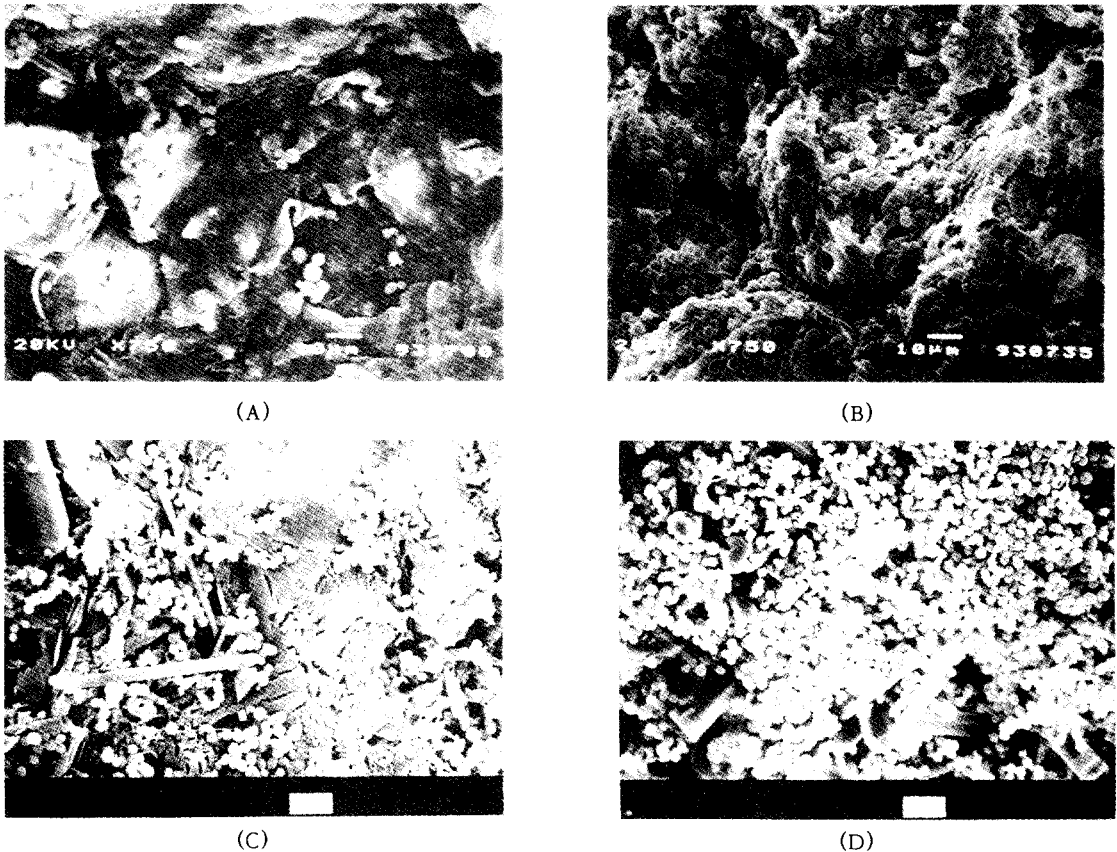


Fig. 12. Scanning electron microphotograph of immobilized cells of K35: (A) Gel surface in ACG gel bead before incubation, (B) Internal surface in ACG gel bead before incubation, (C) Gel surface in ACG gel bead after 21days incubation, (D) Internal surface in ACG gel after 21days incubation.

조를 관찰하였는데, ACG bead가 Ca-alginate bead에 비해 훨씬 온전한 모습을 유지하며, 효모의 농도가 상당히 밀집되어 있음을 보여준다. 반복회분식 배양을 시도했을때 Ca-alginate bead의 경우는 7회분(약 40일)까지는 에탄올 농도와 효모농도가 각각 138g/ℓ-gel과 29~30g/ℓ-gel을 유지하다가 급격히 감소하는 경향을 보였으나, ACG bead의 경우에는 130~150g/ℓ-gel과 32~35g/ℓ-gel의 수준을 유지하였으며, 세포생존률도 약 70% 이상을 유지하였다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 지원(관리번호 921-1000-022-2)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

니다.

참고문헌

1. V. Loureiro and N. van Uden(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1443.
2. T. D'amore and G.G. Stewart(1987), *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 322.
3. P. Gemeiner, L. Kurillova and O. Markovic (1991), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13**, 335.
4. B. Ruggeri, G. Sassi, V. Specchia, F. Bosco and M. Marzona(1991), *Process Biochem.*, **26**, 331.
5. P.S.J. Cheetham, K.W. Blunt and C. Bucke (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2155.

6. S.H. Song(1989), MSc Thesis, Dong-kook University, Seoul, Korea.
7. E.Y. Kim, S.W. Kim and K. Kim(1993), Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **21**, 373.
8. G.L. Miller(1959), Anal. Chem.,**31**, 426.
9. E. Bernet and I. Gutmann(1974), In Methods of enzymatic analysis,(H. U. Bergmeyer, ed.), Vol. 3, 1499, Academic Press, New York.
10. J.S. Pierce(1970), *J. Inst. Brew*, **76**, 442.
11. F. G. King and M. A. Hossain(1982), *Biotechnol. Lett.*, **4**, 531.