

탄화수소로부터 균체단백질의 생산에 관한 연구

정 동 효 · 박 준 희*
중앙대학교 농과대학 식품가공학과
(1978년 11월 26일 수리)

Studies on the Production of Microbial Cell Protein from Hydrocarbon

Dong Hyo Chung · Jun Hee Park

Department of Food Technology, College of Agriculture
Chung-Ang University, Seoul, Korea
(Received Nov. 26, 1978)

Abstract

- 1) To study the productivity of single cell protein from the *n*-paraffin utilizing yeast, 235 yeast strains were isolated from 90 samples.
- 2) Optimum cell growth temperature of three strains selected was 40~45°C and these were identified as *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Torulopsis molischiana*.
- 3) A-28 strain easily assimilated tetradecane, hexadecane and octadecane, but B-8 strain and C-15 strain assimilated more hexadecane than other *n*-paraffins.
- 4) Out of the selected three strains, the mass doubling time, specific growth rate and cell yield were 3.4~4.0 hours, 0.170~0.215, 86~98%, respectively.
- 5) Crude protein, fat, fiber, ash and nitrogen free extract of the selected three strains were found to be 48.2~61.2% 3.7~8.0%, 3.5~4.2%, 5.6~6.7%, 23.5~31.8%, respectively, and thiamine and riboflavin contents of dried yeast cell were 0.78~0.93 mg% and 6.03~7.3 mg%, respectively.
- 6) Yeast protein contained evenly most of amino acid, but the sulfur-containing amino acids were particularly low.

서 론

인구의 기하급수적인 증가로 인하여 식량의 자급증산책으로 저마다 새로운 식량자원의 개발을 서두르고 있다.^(1~4) 그 중에서 균체생산이 다른 자원개발보다 우수함이 인정되어 있다.^(5~10)

1960년경에 이르러 *n*-paraffin^(11,12), 천연가스류⁽¹³⁾ 석유화학제품인 알코올류⁽¹⁴⁾ 등을 기질로 하여 균체생산 즉 단세포단백질(SCP)의 생산은 농지가

필요하지 않은 장치산업(裝置産業)에 의한 단백질의 효율적 생산방법으로 크게 기대되는 산업이다. 더욱 단백질자원 뿐만 아니라 소화성, 경제성, 안정성이 인정되어 사료와 식량자원으로 활용되고 있다.

그러나 공업적으로 균체를 생산할 때 발효열을 많이 발생하므로, 일반 미생물의 최적온도 30°C를 유지하기 위하여 통기 또는 냉각수에 의한 냉각을 하고 있으나 더욱 발효기질이 종래의 탄수화물보다 파라핀이나 메탄의 경우는 약 2~5 배 더 많은 발효열이 발생하므로 원가를 줄이기 위하여서는 무엇보다 시급히 해결할 문제이다.^(15,16)

* 現 : 榮州專門學校(慶北榮州邑)

저자들은 *n*-paraffin 자화성 효모를 30°C에서 분리하지 않고 40°C에서 고온성의 *n*-paraffin 자화성 균을 분리하여 몇 가지의 실험을 하였기에 보고한다.

실험재료 및 방법

1. 미생물 분리원

탄화수소를 유일한 탄소원으로 생육할 수 있는 미생물을 분리하기 위하여 주유소 및 군용유류보

급기지의 유침토양 50여점과 온천하수와 목욕탕 하수토양 40여점을 각각 수집하여 탄화수소 자화 미생물의 분리원으로 하였다.

2. 탄화수소

탄소원으로 사용한 탄화수소의 *n*-paraffin 류는 일본 Nakarai Chemicals Ltd. 제품인 GR 급인 *n*-dodecane, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane, *n*-octadecane 을 사용하였다.

이들의 물리적 성분은 Table 1과 같다.

Table 1. Physical and Chemical Characteristics of *n*-Paraffin.

Name	C _n	Molecular formula	Molecular weight	Melting point(°C)	Boiling point(°C)
Dodecane	12	C ₁₂ H ₂₆	170.34	-9.595	216.278
Tetradecane	14	C ₁₄ H ₃₀	198.39	5.863	253.37
Hexadecane	16	C ₁₆ H ₃₄	226.45	18.155	286.45
Octadecane	18	C ₁₈ H ₃₈	254.50	28.180	315.92

3. 탄화수소 자화균주의 분리

탄화수소 자화균주를 분리하기 위한 기본배지는 Table 2와 같다.

Table 2. Medium for Isolation and Cultivation of Hydrocarbon Utilizing Microorganism.

NH ₄ NO ₃	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.002 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.002 g
Yeast extract	0.01 g
Hydrocarbon	2% (v/v)
Distilled water	100 ml
Initial pH	6.0

500 ml의 진탕플라스크에 Table 2의 배지 30 ml를 분주하여 15 Lbs에서 15 분간 가압살균한 다음 별도로 미생물 분리원(토양) 1g을 생리적 식염수 40 ml에 균일하게 섞은 후 그 상정액 1 ml를 주입하여 고온성 균을 분리하기 위하여 40°C에서 4~7 일간 진탕배양(110 stroke/min)하였다.

이와같이 예비배양한 배양액으로 부터 고체배지(Table 2의 액체배지에다 한천 1.0% 첨가)를 사

용하여 40°C에서 3~6 일간 평판배양한 후 상법에 따라 순수분리를 하였다. 즉 평판배양할 때는 상기의 Table 2의 배지에 1.9% 한천을 가하고 Petri dish에 분주한 다음 *n*-paraffin을 2~3 방울 적하하여 평판위를 깔리게 하였다.

보존배지는 glucose 1%, yeast extract 0.4%, malt extract 0.3%, 한천 1.8%를 사면으로 하여 사용하였다⁽⁴⁾.

4. 탄화수소 자화균의 동정

탄화수소 자화성의 효모류는 형태적 특징, 배양상의 특징 및 생리적 특징에 따라 동정하였다^(18,19).

5. 균체의 정량과 균체수득량

진탕배양된 균체의 주위에는 탄화수소가 부착되어 있으므로 원심분리만으로 쉽게 침강되지 않는다. 고로 일정량의 배양액에 같은 양의 혼합유기 용매(ethanol : butanol : chloroform=10 : 1 : 1)를 가하여 심하게 진탕한 다음 3000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 침전된 효모는 증류수로써 몇 차례 세척하고 나서 다시 증류수로 현탁한 후 그 현탁액을 비탁계(660 nm)에서 균체량을 구하였다.^(20,21)

그리고 상기 세척 균체를 100°C에서 건조하여 건조 균체중량을 구하여 다음과 같이 균체 수득률을 구하였다.

$$\text{균체수득률} = \frac{\text{균체 중량}}{\text{탄화수소 사용량}} \times 100$$

증식속도는 보통 double time [또는 세대시간 (generation time)]이나 비증식속도 specific growth rate)로 나타낸다.

Double time 은 균체량이 두배로 늘어나는 시간이며 비증식속도와와의 사이에는 다음의 관계식이 성립된다.

$$td = \frac{\ln 2 (=0.693)}{\mu}$$

μ : Specific growth rate

td : Double time

$$\text{단 } \mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

X : 균체량

t : 배양 시간

6. 균체의 일반분석

수부, 조단백질, 지방, 조섬유, 회분 등의 일반 분석은 상법에 따라 분석하였다⁽²²⁾.

7. 아미노산과 비타민분석

단백질의 아미노산 조성은 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

Thiamine 은 thiochrome 법, riboflavin 은 lumi-flavin 법으로 각각 정량하였다⁽²²⁾.

결과 및 고찰

1. 균주의 분리

미생물 분리원 90여점에서 고온성 효모류 235 균주를 분리하였다. 이들 균주를 보존배지에 접종하여 45°C에서 생육할 수 있는 균주는 겨우 세 균주(A-28, B-8, C-15)에 지나지 않았다.

비록 많은 균주는 분리되지 않았으나 탄화수소 자화성 효모류가 45°C에서 생육할 수 있는 균주가 발견된다는 것은 이 실험을 통하여 시사할 수 있었다.

2. 배양 온도의 영향

Table 2의 액체배지에 hexadecane을 첨가하여 분리균주(A-28, B-8, C-15)를 각각 접종하여 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C의 각 온도에서 배양한 결과는 Fig. 1과 같다.

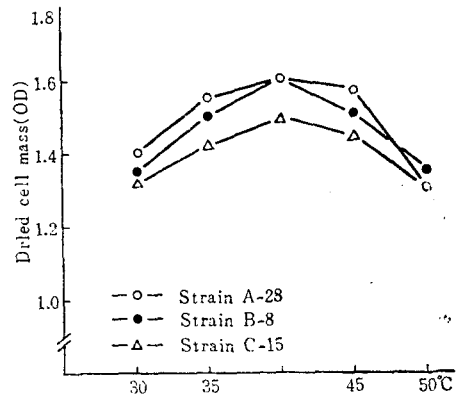


Fig. 1. Effect of Temperature on the Growth of Selected Yeast Strains.

Fig. 1과 같이 분리균주는 다같이 일반적인 효모류의 최적발육온도 이상인 40°C~45°C에서 가장 잘 발육함을 알 수 있었다.

미생물의 증식의 최적온도는 미생물의 종류에 따라 달라 보통 25°C에서 30°C이나 세균에서는 50°C 이상에서 발육하는 고온성 또는 내열성균이 존재하지만,⁽²³⁻²⁶⁾ 고온성의 효모는 발표된 것은 없다.

특히 균체의 양산에 있어서 탄소원을 탄수화물 대신에 탄화수소를 사용할 때는 발효열이 심하게 발생되기 때문에 발효열의 냉각비를 줄이고 한편 잠균의 오염방지의 관점에서 고온성균의 사용이 균체생산 관리상 무엇보다도 요망된다.

Lodder 저의 Yeast 에 따르면⁽¹⁸⁾ *Candida* 속으로 발육온도가 40°C~45°C의 것으로는 *Candida albicans* (43°C~46°C), *Candida blankii* (46°C~47°C), *Candida cacaui* (45°C~46°C), *Candida glabrosa* (46°C~47°C), *Candida krusei* (43°C~45°C), *Candida cusitanae* (41°C~45°C), *Candida macedoniensis* (47°C~48°C), *Candida norvegesis* (41°C~44°C), *Candida stellatoidea* (44°C~47°C), *Candida tropicalis* (41°C~44°C) 등과 *Torulopsis brovina* (44°C~45°C), *Torulopsis inconspicua* (39°C~42°C), *Torulopsis molischiana* (44°C~45°C) 등이 등재되어 있으나 이들의 n-paraffin 자화성 여부는 확인되어 있지 않았다.

본 균주는 이미 우리 나라에서 탄화수소자화성 효모로 분리한 *Candida curvata* HY-69-19의 28°C,⁽¹⁾ *Candida tropicalis* KIST 359의 30~38°C⁽³⁾, 인 최적온도보다 5~15°C 이상 높은 것을 알 수

있었다.

3. 분리균주의 동정

이상 45°C에서 생육할 수 있는 세 균주(A-28, B-8, C-15)에 대하여 형태적, 배양상 및 생리적 특징에 따라^(18,19) 동정한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Morphological Cultural and Physiological Properties of the Selected Yeasts.

Strain No.	A-28	B-8	C-15	Strain No.	A-28	B-8	C-15
1. Shape	Spheroidal ovoidal cylindrical elongate	Spheroidal ovoidal cylindrical elongate	Spheroidal ovoidal cylindrical elongate	D-xylose	+	+	-
2. Size (μ)	4~7× 5~12	2~5×3~6	3~5× 5~23	D-Arabinose	-	(±)	-
3. Pellicle	±	-	±	L-Arabinose	(±)	+	-
4. Pseudomycelium	Formation	None	Formation	D-Ribose	-	+	-
5. Ascospore	None	None	None	L-Rhamnose	-	-	-
6. Budding	Multilateral	Multilateral	Multilateral	Glycerol	(±)	(±)	(±)
7. Fermentation of carbon compound				Erythritol	-	+	×
				Ribitol	+	-	-
				Galactitol	-	-	-
				D-Mannitol	+	+	-
				D-Glucitol	+	+	-
				Inositol	+	?	?
				Ethanol	+	+	+
				α -Methyl-D-glucoside	+	-	-
				Salicin	(±)	-	+
				DL-Lactic acid	(±)	-	+
				Succinic acid	+	-	+
				Citric acid	(±)	-	-
				Inositol	-	-	-
Inulin	-	?	?				
8. Assimilation of carbon compound				9. Assimilation of nitrogen compound			
				Potassium nitrate	Absent	Positive	Absent
				D-Glucose	+	+	+
				D-Galactose	+	-	-
				L-Sorbose	(±)	-	-
				Sucrose	+	-	-
				Maltose	+	+	-
				Cellobiose	(±)	+	-
				Trehalose	+	+	-
				Lactose	-	-	-
				Melibiose	-	-	-
				Raffinose	-	-	-
				Melezitose	+	+	-
Inulin	-	-	-				
Soluble starch	+	+	-				
10. Splitting of arbutin	-	-	-				
11. Growth at 45°C	Growth	Growth	Growth				
12. Growth vitamin free	week	Absent	Good growth				
13. Splitting of fat	+	-	+				
14. Gelatin liquifaction	-	-	-				
15. Lithmus milk	Not Coagulated	Not coagulated	Not cagulated				
16. Identifacation	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Torulopsis molischiana</i>	<i>Candida krusei</i>				

Table 3과 같이 A-28 균주는 *Candida tropicalis*, B-8 균주는 *Torulopsis molischiana*, C-15 균주는 *Candida krusei*로 동정될 것 같으나 *Candida tropicalis* 외는 표준균주가 없었으므로 대조시험을

하지 못하였다.

4. *n*-Paraffin의 자화성

탄소수 12에서 18개까지의 *n*-paraffin을 유일의 탄소원으로 하여 분리균주의 자화성을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다.

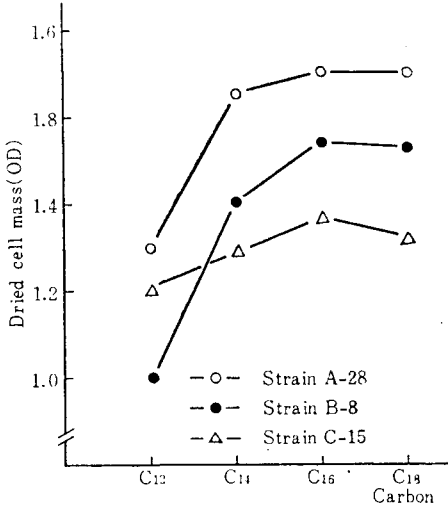


Fig. 2. Effect of Carbon Number of *n*-Paraffin on the Growth of Selected Yeast Strains.

Fig. 2와 같이 A-28 균주는 tetradecane, hexadecane, octadecane을 큰 차이 없이 비교적 균일하게 잘 자화하였고 B-8과, C-15 균주는 hexadecane을 가장 잘 자화하였으나 건조 균체량은 A-28 균주가 가장 높았다. 그리고 A-28, B-8, C-15 균주는 다 같이 dodecane에서 균체증식이 가장 낮았다.

Miller 등과 같이⁽²⁷⁾ 기수 *n*-paraffin의 자화성을 검토하지 못한 것은 유감이지만 Chepigo 씨등의⁽²⁸⁾ 보고와 같이 본균주에서도 C₁₄~C₁₈의 *n*-paraffin이 가장 잘 자화됨을 알 수 있었다.

5. 효모류의 증식속도와 균체수율

공업적으로 균체생산에 이용될 수 있는 균주는 기질에 대한 균체의 수율이 좋고 증식속도가 빠르며 균체는 가급적 큰 것이 좋다. 한편 배양최적온도가 높고 기질의 이용범위가 넓으며 고농도기질에서 배양되는 것이 요구된다.

분리된 균주(A-28, B-8, C-15)에 대한 mass doubling time, 비증식속도, 균체수득률은 Table 4와 같다.

Table 4와 같이 mass double time은 3.4~4.0, 비증식속도는 0.71~0.215hr⁻¹, 그리고 기질인 탄화수소에 대한 균체수득률은 13.5~15.8로 균주에

Table 4. Characteristics of Productivities for Selected Yeast Strains.

Strain number	Mass double time(hr)	Specific growth rate(hr ⁻¹)	Cell yield (%)
A-28 (<i>Candida tropicalis</i>)	3.4	0.215	98
B-8 (<i>Torulopsis molischiana</i>)	4.0	0.170	90
C-15 (<i>Candida krusei</i>)	3.7	0.185	86

따라 약간의 차이가 있었다. 세 균주중 균주 A-28이 mass doubling time이 가장 짧고 균체수득률이 가장 좋았다.

균체의 증식속도나 균체수율은 생산균의 종류나 배양조건에 따라 크게 영향되나 탄수화물을 기질로한 경우 일반적으로 효모의 doubling time은 약 2시간이나 *n*-paraffin이 기질인 경우는 가장 짧은 doubling time은 *Candida gilliermondii*가 3시간 *Candida robusta*가 3.1시간이고, gas oil이나 kerosene 등의 석유유분을 기질로한 경우는 *Candida* 속의 효모에서 약 4시간인 것도 있다^(27,28).

n-Paraffin으로 생산되는 효모의 최대균체수율은 생산균, 기질의 종류, 배양조건에 따라 크게 영향을 받는다. 그러나 methane 자화성 세균의 균체수율은 기질당 60% 전후이나 *n*-paraffin 자화성 세균의 균체수율은 70~100%이며 특히 *n*-paraffin 자화성 효모의 균체수율이 100%이상의 균으로 *Candida lipolytica* (101.7), *Candida pelicalosa* (103.0), *Candida arborea* (109.5) 등이 알려져 있으나 분리 균주중 A-28 균주만 균체수율은 Chepigo 등이 발표한 것보다 뒤지는 98%이었다⁽²⁸⁾.

6. 선정된 효모균체의 일반성분

균체생산에 있어서 배양공학적인 균의 특성도 중요하지만 균체 영양성분의 종류와 함량이 보다 중요하며 특히 단백질의 함량이 많고 기타 영양가가 높은 미량성분들의 함량이 높을 것이 요망된다.

분리된 균주(A-28, B-8, C-15)에 대한 단백질 이외의 일반성분과 비타민 함량의 결과는 Table 5와 같다.

분리된 균주중 A-28 균주가 단백질함량이 58.7%로 제일 높고 B-8 균주는 46.0%로 가장 낮았다.

균체의 성분은 균종, 원료에 따라 함량의 차이

Table 5. General Composition and Vitamin Content of the Selected Yeast Strains.

Strain number	Moisture (%)	Protein (%)	Fat (%)	Fiber (%)	Ash (%)	NFE (%)	Thiamine (mg%)	Riboflavin (mg%)
A-28 (<i>Candida tropicalis</i>)	4.6	58.7 (61.5)*	3.7	3.5	6.0	23.5	0.93	7.30
B-8 (<i>Torulopsis molischiana</i>)	4.4	46.0 (48.2)*	8.0	4.2	5.6	31.8	0.87	6.03
C-15 (<i>Candida krusei</i>)	4.9	50.3 (51.9)*	3.8	3.8	6.7	30.5	0.78	6.82

* : Dry base

가 있으나 일반적으로 단백질은 세균이 효모보다 많아 60~80%, 효모는 40~60%이다⁽²⁹⁾.

B. P. Lavera 회사의 *Candida* 균체 단백질함량은 68.5%, B. P. Grangemough의 것은 65%인데 비하여⁽³⁰⁾ A-28 균주의 단백질함량은 7~10% 정도 낮았다. 그러나 일본 Kanegabuchi 회사의 *Candida* 균체보다 4.6% 정도 단백질함량이 높았다⁽³¹⁾.

특히 본 균주는 이미 우리나라에서 gas oil을 원료한 균체의 단백질 함량 59.8%와 유사하며⁽³³⁾, kerosene을 기질로한 균체단백질보다 10~18% 정도 높았다.

그리고 비타민중 riboflavin이 thiamine보다 7~8배 많이 함유된 것은 일반균체의 경우와 마찬가지로 지이나⁽³²⁾ 다른 비타민까지 정량하지 못한 것을 유감으로 생각한다.

7. 선정된 효모단백질의 아미노산조성

Table 5에서 선정된 효모균체의 단백질함량은 A-28 균주가 가장 높았으므로 우선 이 한 균주에 대한 아미노산조성을 본 결과는 Table 6과 같다.

Table 6. Amino Acid Composition of the Selected Yeast Strain.

Amino acid	Amino acid (mg/Ng)	Amino acid (g/100g)
Lysine	300.7	2.824
Histidine	90.7	0.852
Arginine	213.6	2.006
Aspartic acid	454.0	4.264
Threonine	290.9	2.732
Serine	261.9	2.460
Glutamic acid	990.7	9.304
Proline	196.3	1.843
Glycine	255.3	2.398
Alanine	309.7	2.908
Cystine	—	—

Valine	285.2	27.8
Methionine	60.8	0.571
Isoleucine	255.4	2.398
Leucine	400.5	3.761
Tyrosine	201.5	1.889
Phenylalanine	233.1	2.189

Table 6과 같이 효모균체 100g 중 필수아미노산은 골고루 함유되어 있으나 함황(含黃) 아미노산인 methionine은 극미량 함유되었고 특히 cystine은 검출되지 않았다. 그러나 산성 아미노산은 현저하게 많이 함유되어 있다.

요 약

1) 고온성으로 탄화수소를 자화할 수 있는 균체를 생산하는 목적으로 90여점의 시료로부터 세 균주의 효모를 선별하여 다음의 결과를 얻었다.

2) 선정된 세 균주 효모의 최적생육온도는 40°C~45°C였다. 그리고 이들은 각각 *Candida tropicalis*(strain A-28), *Torulopsis molischiana*(strain B-8) 그리고 *Candida krusei* (strain C-15)로 각각 동정되었다.

3) 특히 균주 A-28은 tetradecane, hexadecane과 octadecane을 다같이 쉽게 자화하였고 B-8과 C-15 균주는 다른 n-paraffin보다 hexadecane을 잘 자화하였다.

4) 선정된 세 균주효모의 세대시간은 3.4~4.0시간, 비증식속도는 0.170~0.215이고 그리고 균체수율은 86~98%이었다.

5) 이들 균체의 조단백질은 48.2~61.5%, 지방은 3.7~8.0%, 조섬유는 3.5~4.2%, 회분은 5.6~6.7%, 무질소가용성 물질은 23.5~31.8%였고, thiamine은 0.28~0.93 mg%, riboflavin 6.03~7.3 mg%이었다.

6) 균체단백질의 아미노산조성은 비교적 골고루

함유되었다. 그러나 합황(sulfur containing) amino acid 는 극히 적었다.

인 용 문 헌

- 1) 이계호, 신현경 : 한국농화학회지, **13**, 43 (1970).
- 2) 강효원, 정동효, 최문갑 : 과학기술처 1970년 연구개발사업보고서 MOST-R-70-53-CH(1970).
- 3) 권태완, 민태익, 박용, 변유량 : 한국식품과학회지, **2**, 56 (1970).
- 4) 강효원 : 산업미생물학회지, **2**, 149 (1974).
- 5) 醱酵協會(日本) : 醱酵協會誌, **32** 220 (1974).
- 6) 醱酵協會(日本) : 醱酵協會誌, **32**, 265 (1974).
- 7) 醱酵協會(日本) : 醱酵協會誌, **32**, 363 (1974).
- 8) 醱酵協會(日本) : 醱酵協會誌, **32**, 411 (1974).
- 9) 醱酵協會(日本) : 醱酵協會誌, **33**, 10 (1975).
- 10) 醱酵協會(日本) : 醱酵協會誌, **33**, 45 (1975).
- 11) Wang, D. I. C. : *Chem. Eng.*, August, **26**, 99 (1969).
- 12) Champagnet, A., Uernet, B. C., Laine, B., Filosa, J. : *Nature*, **197**, 13 (1963).
- 13) Foster, J. W., DAVIS, R. H. : *J. Bact.*, **71**, 1924 (1966).
- 14) Mor, J. R., Fiechter, A. : *Biotech. Bioeng.*, **10**, 189 (1968).
- 15) Guenther, K. R. : *Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 445 (1965).
- 16) 光琳書院(株) : 微生物蛋白質의生産利用技術의現況と展望, 1~104 (1974).
- 17) フジ・テクノシステム(株)編 : 微生物の利用・應用技術資料集, 1~138 (1950).
- 18) Lodder, J., Kreger-Uan, R. J. W. : *The Yeast, A Taxonomy Study*, 2nd Ed., Interscience Pub. Inc. (1971).
- 19) 飯塚廣, 後藤昭二 : 酵母の分類同定法, 東京大學出版會 (1969).
- 20) 中原忠篤, 久塚謙一, 山田浩一 : 石油と微生物 No. **1**, 32 (1968).
- 21) 宇佐美昭次 : 醱酵協會誌, **27**, 379 (1969).
- 22) 鄭東孝, 張賢基, 金明燦 : 最新食品分析法, 三中堂 (1973).
- 23) Mateles, R. I., Brauch, J. N., Tannenbaum, S. R. : *Science*, **157**, 1322 (1967).
- 24) Klug, M. J., Markouetz, A. J. : *Nature*, **215**, 1082 (1967).
- 25) 野宗嘉明 : 醱酵協會誌(日本), **29** (7), 332 (1971).
- 26) 水澤清, 吉田文彦 : 醱酵協會誌(日本), **31**(3), 83 (1973).
- 27) Miller, T. L., Lie, S., Johnson, M. J. : *Biotech. and Bioeng.*, **6**, 299 (1964).
- 28) Chepigo, S. U. : *7th World Petroleum. Congress, Mexico* (April, 1967).
- 29) Daniel, I., Wang, C. : *Chem. Eng.*, **15**, 99 (1968).
- 30) Bennett, I. C., Hondermarck, J. C., Todd, J. R. : *Hydrocarbon Processing*, **48** (3), 104 (1969).
- 31) Takeda, T. : *Hydrocarbon Processing*, **48**, 99 (1969).
- 32) Champagnet, A. : *Nature*, Jan., **5** (1963).