

農産廢資源의 微生物學的 利用에 關한 研究

(第11報) *Trichoderma* sp KI 7-2 가 生産하는 纖維素分解酵素의 性質 및
醱酵飼料에의 應用

裴武 · 李啓準 · 卓善美 · 金炳弘

韓國科學技術研究所 應用微生物研究室

(1978년 1월 20일)

Studies on the Microbial Utilization of Agricultural Wastes

(Part 11) Properties of Cellulolytic Enzyme Produced by a Cellulolytic Fungus
Trichoderma sp. KI 7-2 and its Application to the Fermented Feed Production

Moo Bae · Kye Joon Lee · Sun Mee Tack and Byung Hong Kim

Applied Microbial Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(Received Jan. 20, 1978)

Abstract

In order to develop the processes for the production of fermented feed from cellulosic agricultural by-product, cereal straw, by the action of cellulolytic fungus, the properties of the cellulolytic enzyme produced by *Trichoderma* sp. KI 7-2 was studied. A higher enzyme activity was obtained in the culture added by 1% rice or barley straw powder than in the culture of pure cellulose. The crude enzyme was prepared by precipitating from 20~60% saturated ammonium sulphate of the culture supernatant. The optimum conditions for the enzyme reaction were temperature of 50°C and pH 4.2. The crude enzyme was stable at 50°C for two hours and at pH between 4 and 6.

These properties were adopted for the fermented feed production, and several production. Thus, several processes of semisolid culture were devised to upgrade the fermented feed and to develop into the acceptable quality.

序 論

볏짚을 비롯한 각종 農産副産物은 반추동물의 중요한 에너지源이 되고 있는 cellulose와 hemicellulose로 되어 있기는 하지만 단백질함량이 낮고 lignin 및 silica의 含量이 높아서 소화율이 낮으며 嗜好性이 나빠 粗惡한 粗飼料의 범위에 속한다⁽¹⁾.

이러한 볏짚의 그 飼料的 價値를 增進시키기 위

하여 粉碎粉末化²⁾, ball mill 處理 등으로 물리적인 조적을 파괴시키든가, NaOH, KOH, Ca(OH)₂ 등 알칼리로 처리하여 화학적인 조적을 변경시키는 방법등이 일찍이 사용되어 왔다^(3,4).

또한 蛋白質의 含量을 增加시키기 위하여 약산 등으로 처리한 뒤에 오탄당을 이용하는 *Candida utilis* 등의 효모를 배양하는 방법이 제시되었으며⁵⁾ 볏짚의 섬유질을 직접 소화할 수 있는 *Cellulomonas* 속의 미생물 속을 배양하는 방법이 보고 되었다⁽⁷⁾.

저자들은 전보에서 보고된 대로⁽⁷⁾ 섬유소 분해효소를 강력히 생산하는 균주를 분리 취득하였는데, 이 균주가 생산하는 효소의 성질을 규명하고 이 성질을 이용하여 벚짚을 발효시키는 방법 등을 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

1. 供試菌株

전보⁽⁷⁾에서 선별된 섬유소분해효소 생산이 높은 *Trichoderma* sp. KI 7-2 를 사용하였다.

2. 사용 기질

酵素生産 및 酵素反應 기질로 다음의 섬유소 혹은 섬유소 함유물질을 사용하였다.

Cellulose powder: Cellulose SF 11 (Whatman)
Bacto-Cellulose (Difco)

Pulp powder: 시중의 Kraft pulp 를 ball mill 한 것.

Carboxy methyl cellulose (Sigma)

보릿짚, 벚짚(경기도 파주군산)(회사)

Filter paper (Whatman No. 1)

3. 使用培地

供試菌株의 보존용배지는 전보의 동일하였으며, cellulase 의 성질을 검토하기 위한 cellulase 생성

Table 1. Composition of the Basal Medium for Cellulase Production in Submerged Culture and Semi-Solid Culture (Koji).

A. Submerged Culture.

Substance	Gram per liter
KH ₂ PO ₄	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4
NH ₂ CONH ₂	0.3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.2
Peptone	0.1
MnSO ₄ · H ₂ O	1.56 × 10 ⁻³
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5.0 × 10 ⁻³
ZnCl ₂	1.67 × 10
CoCl ₂	2.00 × 10
Distilled water	1 liter

pH 5.0 before autoclave

B. Semi-Solid Culture.

1 kg of wheat bran were mixed with 2 l of tap water in wood case and autoclaved under 121°C, for 154 min.

배지는 Table 1 과 같았고 飼料생산을 위한 cellulase 의 생성배지는 밀기울 배지를 사용하였다.

4. 培養方法

액체심층배양은 500 ml 삼각플라스크에 100 ml 의 발효배지를 넣고 25°~27°C 에서 5 일간 진탕배양 하였으며, 밀기울배지에서의 배양은 수분함량 70 %로 조정된 멸균 밀기울에 공시균의 포자를 접종 하여 27°C 항온합습배양실에서 3 일간 배양하였다.

5. 粗酵素液의 調製

액체배양한 배양액을 원심분리하여 고형물을 제거하고 그 상등액에 (NH₄)₂SO₄ 를 포화도 20, 40, 60%로 점차 증가 시키면서 형성되는 침전을 38, 000 × g 에서 30 분간 원심분리하여 취하였다.

각 分割에서 얻은 침전의 역가를 측정하여 活性이 있는 分割를 모아 증류수에 녹여 透析시켜서 粗酵素液으로 하였다.

6. 酵素活性測定 및 特性檢討

1) 粗酵素의 活性은 전보의 동일한 방법으로 측정하였다.

2) 最適活性 pH 는 Na-acetate buffer 로서 3.3, 3.7, 4.1, 4.6, 5.0, 5.6로 조정된 상태에서 한시간 반응시킨 뒤의 활성을 측정하여 相對活性度를 求하였다. 2) 最適活性溫度는 반응액의 온도를 30°C, 40°C, 50°C, 60°C 및 70°C 로 하여 한시간 반응시킨 뒤의 活性을 각각 측정하여 相對活性度를 얻었다.

3) pH 의 安定性은 McIlvaine buffer pH 2.2~8.0 에 粗酵素를 용해시킨 뒤 상온에서 40 시간 경과 후 pH 를 4.2 로 조정하여 잔여활성을 각각 측정하여 相對活性度를 얻었다.

4) 熱安定性은 pH 4.2 로 조제한 효소액을 30°C 40°C, 50°C 및 70°C 의 water bath 에서 한시간 내지 5시간 방치한 뒤 最適온도에서 한시간 계속 반응시켜 잔여활성을 측정하여 相對活性度를 求하였다.

7. 基質의 酵素感受性 測定

Cellulase 시판품인 Onozuka SS-1500 cellulase 를 이 효소의 작용 最適온도 및 pH 인 45°C, pH 5.0 에서 24시간 작용시킨 뒤 최초로 사용한 기질량 중에서 효소에 의해 용해된 양을 비교하여 total soluble after enzyme treatment(TSAE)를 측정하였다.

實驗結果 및 考察

1. 深部培養에 의한 酵素의 生産

곰팡이의 경우 cellulase는 適應酵素로서 사용하는 炭素源에 영향을 받는 것으로 알려져 있다⁽⁸⁾.

*Trichoderma viride*의 cellulase의 생성은 cellulose, lactose, cellobiose 및 glucose에 의하여 induction된다고 Mandel 등이 보고하였는데⁽⁸⁾ 이중 glucose의 경우는 cellulase에 混存된 sophorose에 의한 것으로 밝혀졌다. 즉 순수한 cellobiose를 비롯한 기타의 당에 의하여서는 cellulase가 전혀 생성되지 않으며 sophorose는 cellobiose에 비해 2,500~2,800 배로 cellulase 생성을 induction하는 것으로 報告되었으나 널리 이용할 수 없기 때문에 cellulase가 cellulase 생산에 주로 이용되고 있다.

따라서 醱酵培地の 炭素源으로 天然纖維素, 純粹한 纖維素 및 CMC 등을 사용한 결과 Table 2와 같이 纖維素分解酵素의 生成이 각각 다르게 나타남을 볼 수 있었다.

정제된 순수한 섬유소를 사용한 것 보다는 천연 섬유소인 보리짚을 사용한 데에서 우수한 결과를 얻었다.

그리고 천연 보리짚을 전처리할 때 hammer mill로서 粉碎한것 보다는 분쇄 후 가성소오다로 처리한 것이 좋았으며 가성소오다 처리 후 水洗하면 酵素生成이 오히려 떨어지는 결과를 각각 얻었다.

이러한 결과는 Peitersen 등의 보고와 일치되는 데⁽⁹⁾, 이는 가성소오다 처리 후 水洗함으로써 제거

Table 2. Effect of Different Substrates on the Production of Cellulase by *Trichoderma* spp. K1 7-2.

Carbon sources in the medium	F.P.-Cellulase activity *(unit/ml)
Cellulose CF11	0.18
Bacto-cellulose	0.77
Carboxymethylcellulose	1.62
Pulp powder	0.74
Barley straw powder (rice straw)	
1. hammer milled powder (24~40 mesh)	1.22
2. NaOH 3%, 121°C, 30min. Cooked, washed out,	0.31
3. NaOH 3%, 121°C, 30 min. Cooked and neutralized.	2.44

된 각종 水溶性物質이 本 供試菌株의 酵素生成에 阻害의이 아니고 오히려 促進의으로 作用한다고 판단되며 이는 알칼리처리 후 수세로 용해되어 소실되는 부분중 사용균에 의해 쉽게 자화되는 hemice llulose 등이 중화할 경우 균체생산을 증가시키고, 효소생산 또한 증가되는 것으로 생각된다.

보릿짚은 벧짚에 비해 분쇄하기 쉽고 원료자체에 異物質이 적어 쉽게 사용될 수 있는 원료이므로 보릿짚 분말을 탄소원으로 하여 액체배양을 하여 생산된 효소의 성질을 검토하기로 하였다.

2. 酵素의 分割 및 特性

供試菌의 배양액을 황산암모늄分別法으로 얻은 침전물의 량과 그 活性은 Table 3과 같았다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20~60% 화용액에서 얻은 침전물의 活性

Table 3. Cellulolytic Activity Recovery in the Precipitates by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Conc. of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for fractionation (%)	*Total weight of precipitation (mg)	**F.P. Cellulase Activity	
		Specific (unit/mg)	Total (unit)
10	49	0.03	1.49
20	27	0.41	10.97
40	40	3.02	120.60
60	40	0.52	20.70
70	45	0.00	0.00

*Total weight of precipitation was measured as pure protein.

**F.P. Cellulase activity; 1 unit 1 mg of glucose produced 1 hr. reaction.

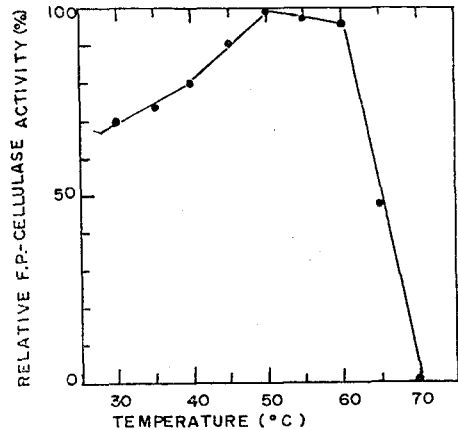


Fig. 1. Effect of Temperature on the Activity of Crude Cellulase (pH 4.2, one hour reaction).

이 높으므로 이 分割을 한때 모아 透析시킨 후 酵素의 特性을 검토하였다.

(1) 最適活性溫度 및 熱安定性: Fig. 1에서 나타난 것과 같이 50°C에서 活性이 가장 강하였고 60°C에서는 96%, 40°C에서는 76% 상대 활성을 나타냈다. 열에 대한 안정성을 검토한 결과는 Fig. 2 같았다. 즉 作用最適溫度인 50°C에서의 作用時間에 따른 酵素活性의 維持정도를 검토한 결과 본 供試菌株가 생성하는 cellulase는 作用最適溫度인 50°C에서는 2시간까지는 安定하며 60°C에서는 매우 不安定하나 酵素의 活性은 반응초기에 활발히 나타나는 것으로 판단되었다.

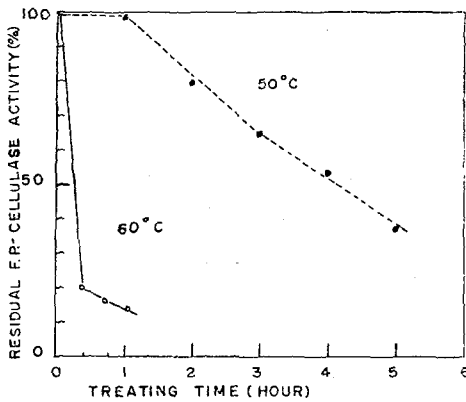


Fig. 2. Thermal Stability of Crude Cellulase vs Treating Time at pH 4.2.

(2) 最適活性 pH 및 安定性: 反應液의 pH를 Na-acetate buffer 로서 변화시켜 酵素活性을 측정

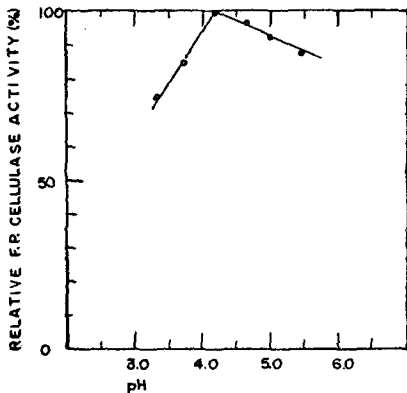


Fig. 3. Effect of pH on the Activity of Crude Cellulase (50°C, one hour reaction).

한 결과는 Fig. 3과 같았다. 즉 pH 4.2에서 活性이 강하게 나타났으며 pH 4.2이하 및 그 이상에서는 活性이 떨어진 것을 알 수 있었다.

Mellvaine buffer 내에서의 pH에 대한 安定性은 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 pH 6.0에서 가장 안정하였고 pH 4.0~5.0에서도 비교적 안정하였으나 pH 3.0이하 pH 7.0 이상에서는 활성이 떨어졌음을 알 수 있었다. 따라서 이 효소는 약산성에서 더 안정함을 보여주고 있었다.

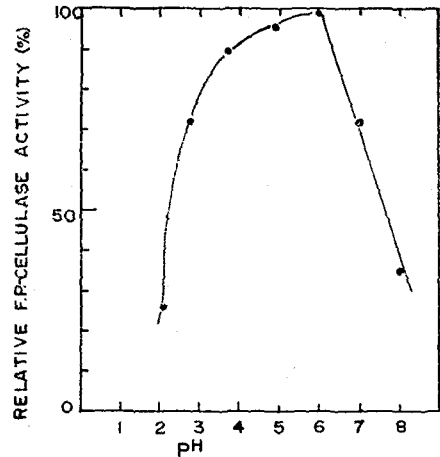


Fig. 4. Effect of pH on the Stability of Crude Cellulase (after 40 hour at 20°C).

이러한 결과는 Reese 등이 *Aspergillus luchuensis*에서 얻은 cellulase의 最適活性 pH는 5.0이었고 pH 5.0에서 7.0까지는 안정하였다는 보고⁽¹⁰⁾와 Okada 등이 *Trichoderma viride*에서 얻은 cellulase의 경우는 4.5~5.0에서 活性이 가장 높았다는 보고⁽¹¹⁾ 및 成⁽¹²⁾이 얻은 *Trichoderma viride*의 cellulase는 最適 pH는 5.0이었다는 보고와는 相異한 결과라 할 수 있었다.

本효소의 諸 特性을 검토하기 위하여는 粗酵素를 分離정제 하여 각각의 성질을 규명하여야 할 것이다, 醱酵飼料生産을 위하여서는 이상의 결과로서 응용할 수 있었다.

3. Koji 製造에 依한 酵素生産

밀기울배지에서 곰팡이를 배양할 때 벗짚분말을 여러 가지로 처리하여 25~75% 밀기울을 대치하였을 때 효소의 생성량 및 菌 성장 정도를 검토한 결과는 Table 4와 같았다.

벗짚을 전혀 사용하지 않은 것에서의 菌 성장은 가장 좋았으나 효소의 생성량은 벗짚을 25%~50% 첨가하는 것이 효소의 생산량이 증가하였고 벗짚

Table 4. Cellulolytic Activities of Semi-Solid Culture Grown *Trichoderma* sp. on the Mixture of Wheat Bran and Rice Straw to Different Ration.

	Rice straw/Wheat bran		Cellulolytic activities		
			Cx-cellulase (unit)	F. P.-cellulase (unit)	Growth
Untreated	75	/ 25		0.10	+ 1
	50	50		0.28	+ 2
	25	75		0.06	+ 3
Ca(OH) ₂	75	25	3.33	0.96	+ 1
	0.25%	50	2.83	0.80	+ 2
	washed	25	3.47	1.38	+ 3
Ca(OH) ₂	75	25	2.80	1.83	+ 2
	0.25%	50	3.04	1.68	+ 3
	neut'zd	25	2.58	0.73	+ 4
	0	100	2.51	0.50	+ 5

Enzyme unit mg of D-glucose produced/hr/g of seed dry basis culture condition 26°C, 3 days.

Table 5. Effect of Thermal & Alkaline Treatment of Rice Straw on the Susceptibility to Cellulase.

Condition for heat and alkaline treatment	Total soluble after enzymet (%)
Control	28.69(100)
0.25% Ca(OH) ₂ 10°C 3 hr	30.16(105.12)
0.25% Ca(OH) ₂ 30°C 3 hr	29.54(102.96)
0.25% Ca(OH) ₂ 100°C 1 hr+30°C 2 hr	34.19(119.17)
100°C 1 hr —	33.85(117.85)*
0.25% Ca(OH) ₂ 121°C 1 hr+30°C 2 hr	35.68(124.36)
" 121°C 30 min+30°C 2.5 hr	37.11(129.35)**
" 121°C 15 min+30°C 3 hr	34.94(121.78)
" 121°C 15 min+30°C 1 hr	36.42(126.94)
0.25% Ca(OH) ₂ 121°C 15 min	35.15(122.52)
— 121°C 15 min	34.11(118.89)
NaOH 1% 30°C 6 hr	35.67(124.33)
" 15 hr	36.72(128.00)
" 22 hr	37.56(130.92)
NaOH 2% 30°C 6 hr	35.63(124)
" 15 hr	39.38(137.26)
" 22 hr	42.18(147.02)
NaOH 3% 30°C 6 hr	42.80(149.18)
" 15 hr	— —
" 22 hr	42.18(147.02)

Cellulase used: Onozuka SS-1500

Reaction condition: at 50°C pH 5.0 acetate buffer for 72 hr

Enzyme/Substrate=5/10 (w/w)

을 분쇄하여 그대로 사용하는 것보다는 Ca(OH)₂ 로 처리한 뒤 H₃PO₄ 으로 중화하는 것이 좋았음을 알았다.

4. 볏짚의 前處理

볏짚을 농가에서 사료로 이용하고 있지만, 섬유질의 구조가 결정성이고 칩쇄도가 길어 소화율이

낮은 형편이다. 이러한 볏짚을 物理化學的 方法으로 처리하면 cellulase 에 의해 쉽게 分解된다⁽¹³⁾.

本 供試菌株가 생성하는 cellulase 로서 볏짚을 處理하여 사료적 가치를 증진시키고자 할 때 볏짚의 전처리효과를 측정하 결과 Table 5 와 같았다. 즉 hammer mill 로서 2~3 mm 되도록 분쇄한 것을 0.25% (w/w) 의 소석회를 물에 현탁시켜 rice straw/water=1/2 정도로 하여 121°C 에서 30 분간 蒸煮한 뒤 상온에서 두 시간 경과함이 酵素의 感受性이 가

장 좋았음을 알았다.

따라서 基質로서의 볏짚의 前處理條件으로 選擇하였다.

5. 醱酵法의 開發

酵素를 生産할 때 深部培養보다는 koji 培養法이 시설이 간편하므로 koji 法을 채택하였다.

供試菌株가 생산하는 cellulase 의 성질, 효소 생산방법 및 기질전처리 조건등을 종합적으로 고려하여 고안한 발효방법은 Fig. 6, Fig. 7과 같다.

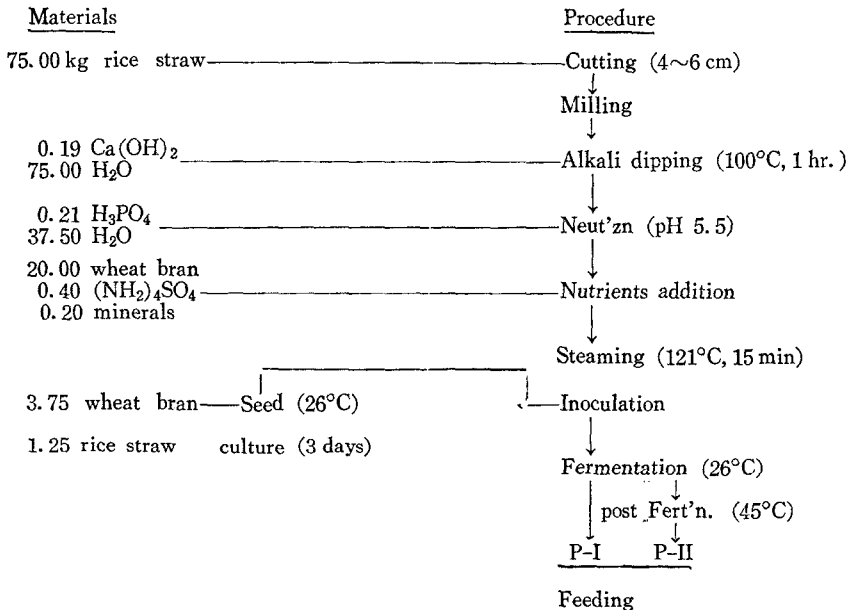


Fig. 5. Production Procedures Materials Balance of Fermented Rice Straw (Process I and II).

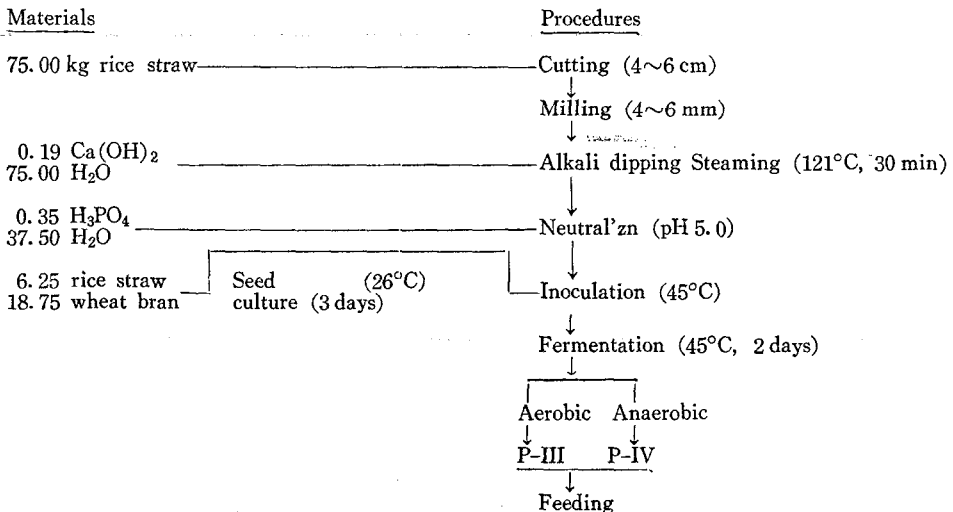


Fig. 6. Production Procedures & Materials Balance of Fermented Rice Straw (Process III and IV).

Table 6. Changes in Reducing Sugar, Cellulolytic Activities and Volatile Fatty Acids by Storage or 2nd Fermentation Conditions (Process II).

Conditions		Reducing sugar					Cellulolytic activity (cm)				pH		
Temp.	Period (day) state	0	2	5	9	15	0	2	5	9	0	5	9
4°C	Closed	0.45	0.66	0.73	1.06	1.0	3.0	3.0	3.1	3.0	6.0	6.0	6.0
	Open		0.77	0.64	0.84	0.92		3.1	2.9	2.8		6.0	6.0
10°C	Closed		0.59	0.58	0.97	—		2.99	3.0	2.9		6.0	6.0
20°C	Closed		0.65	0.80	1.02	—		3.1	2.9	—		5.5	5.0
	Open		0.65	0.62	2.00	*		3.1	3.0	*		6.0	*
30°C	Closed		1.5	1.7	1.9	2.2		3.1	3.0	2.8		5.0	4.0
45°C	Closed		2.0	3.0	4.3	4.8		3.4	2.6	2.6		5.0	4.6

R. Straw/W. Bran=3/1, 26°C, 2 days continued.

Conditions		pH			Volatile fatty acid				
Temp.	Period (day) state	0	5	9	Total1*	F*	A*	P*	B*
4°C	Closed	6.0	6.0	6.0	0.14	1.2	96.8	0.6	1.4
20°C	Closed		5.5	5.0	0.54	—	100	—	—
	Open		6.0	*	0.29	22.9	76.2	0.23	0.55
30°C	Closed		5.0	4.0	0.73	0.5	95.7	—	3.8
45°C	Closed		5.0	4.6	0.5	0.2	98.8	—	1.0

*1 : m mol. of NaOH required for the neutralization of acids in 1g of sample dry basis, after 5 days.

*F : Formic acid, A : acetic acid P : propionic acid, B : n-butyric acid

즉 방법 P-I, P-II을 검토하면 분쇄한 볏짚분말을 소석회 0.25%로서 steaming 한 뒤 H₃PO₄로 pH 5.5까지 중화하고 밀기울을 25% 혼합한 다음 멸균 후 중균하는 것으로 이는 곧 koji 법에 의한 효소 생산단계라 할 수 있다. 이것을 그대로 급여하는 것이 방법 P-II이고 방법 P-I는 생산된 효소로서 섬유질을 분해할 수 있도록 효소의 작용온도를 45°C로 하여 주어서 효소의 안정성을 유지할 수 있도록 고려한 것이다.

방법 P-III 및 P-IV은 효소생산단계를 별도로 준비하여서 전처리한 볏짚에 혼합하여서 역시 볏짚을 분쇄하고자 한 것이다. 방법 P-I은 본 供試菌의 *Atpergillus*속 등을 사용하면 단시일에 성장하므로 균체단백질을 공급할 수 있는 장점이 있는 것으로 판단되었으며 방법 P-I의 연속인 P-II방법을 통기상태 또는 통기차단 상태에 그 온도를 40°C에서 45°C까지 변화시켜 본 결과 상온에서 통기를 차단하지 않았을 경우 부패하였으나 통기를 차

단한 결과 40일 까지 부패되지 않았으며 오히려 Table 6와 같이 유기산이 생성되어 기호성이 증진되었음을 알았다.

그러나 방법 P-I 및 P-II의 단점은 방법 P-I까지 순수배양이 가능하도록 하여야 하므로 이를 보완할 수 있도록 방법 P-III를 제시하여 실시한 결과 순수배양하여야 하는 양이 $\frac{1}{4}$ 정도로 감축이 가능하면서 제품의 기호성 및 사료가치에 방법 P-II에 의한 것보다 뒤지지 않았음을 알았고, 제품의 생산단가를 절감할 수 있었다.

이상의 방법으로 생산한 제품을 韓牛에 급여하여 그 증체율등 사육시험을 실시한 결과의 자세한 보고는 차후에 있을 예정이다.

要 約

섬유소분해효소 생산균인 *Trichoderma* sp. KI 7-2의 cellulase 생성을 위한 탄소원으로는 순수한

섬유소보다 벚짚 보리짚 분말을 사용하는 것이 좋았으며 1% 첨가에서 침부배양한 액을 유산농도 20~60%로 떨어뜨린 침전에서 cellulase의 활성이 나타났다.

이 조효소의 작용최저온도는 50°C, 최적 pH는 4.2였으며, 열에 대한 안정성은 50°C에서 2시간까지 100%활성을 유지하였고 pH에 대한 안정성은 pH4~6에서 안정하였지만 pH 4이하 및 pH 6.0 이상에서는 불안정하였다.

이러한 성질의 효소를 생산하는 균주로서 벚짚 발효시키는 몇 가지 방법을 아울러 검토하였다.

參考文獻

- 1) Y. W. Han and A. W. Anderson: *Economic Botany*, **28**, 338 (1974).
- 2) A. T. Ralston, W. H. Kennick, T. P. Davidson and K. E. Rowe: *J. Animal Sci.*, **25**, 29 (1966).
- 3) Beckmann, E.: *Chem. Abt.*, **16**, 765 (1922).
- 4) Tarkow, H and W. C. Feist: *Adv. in Chem.*, **95**, 197 (1969).
- 5) Lekprayoon, C.: *Rye Grass Straw Hydrolyzate*, M. S. Thesis, Oregon State University (1972)
- 6) Han. Y. W., C. E. Dunlanp, and C. D. Callihan: *Food. Technol.*, **25**, 32 (1971).
- 7) Moo Bae, B. K. Kim and K. J. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **4**, 105 (1976).
- 8) Mandell, M. and E. T. Reese: *J. Bact.*, **73**, 269 (1957).
- 9) Peiterson, N.: *Biotech. & Bioeng.*, XVII 361 (1975).
- 10) Reese. E. T., Siu, B. G. H. and Levinson, H. S. *J. Bact.*, **59**, 485 (1950).
- 11) Okada, G.: *J. Biol. Chem.*, **77**, 33 (1975).
- 12) Sung Nack-Kie: *Retearch Bulletin of Chinju Agricultural College* No.10 (1971).
- 13) Han. Y. W. and C. D. Callihan: *App. Microbiol.*, **27**, 159 (1973).
- 14) Guggoly. J., R. M. Saunders, G. M. Saunders, O. Kohler and T. J. Kloppenstein: *J. Anim. Sci.*, **33**, 167 (1971).