곰팡이 유지 생산에 관한 연구

제 1 보 : 곰팡이 세포내 유지에 대하여

유진영 · 신동화 · 임 호 · 민병용 · 서기봉
(농어촌 개발 공사, 식품 연구소)
(1980년 2월 4일 수리)

Production of Fungal Lipids

I. On Intracellular Fungal Lipids

Jin Young Yoo, Dong Hwa Shin, Ho Yim, Byong Yong Min and Kee Bong Suh
(*Food Research Institute, Agriculture and Fishery Development Corporation*)
(Received February 4, 1980)

Abstract

Cladosporium fulvum, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus* and N-1 (unidentified species) were cultured on the artificial media containing sucrose as a carbon source at 20, 25 and 30°C for 10 to 12 days. The lipids in the felts were extracted with chloroform-methanol mixture and the class composition and fatty acids of the lipid were determined. The summarized results are as follows:

1. The average felts produced by each species per 100 *ml* of media were 3.82±0.30 *g* for *Cl. fulvum*, 2.62±0.23 *g* for *Asp. ochraceus*, 4.24±0.25 *g* for *Asp. terreus* and 4.62±0.10 *g* for N-1. Their crude fat contents 27.5±1.61 %, 50.47±1.00 %, 46.6±1.59 % and 33.78 % and the fat coefficient 6.92, 8.88, 13.01 and 10.28, respectively.
2. The lipids produced by these species were mainly composed of triglyceride and the next free fatty acid in *Cl. fulvum* and N-1 and phospholipid *Asp. ochraceus* and *Asp. terreus*.
3. The major fatty acids of the lipids were in order of oleic, palmitic, linoleic and stearic acids in *Asp. ochraceus*, *Asp. terreus* and *Cl. fulvum* and linoleic, palmitic, oleic and stearic acid in N-1. The total percentage contents of these major fatty acids were over 98 % the former and over 95 % the latter.
4. The constituent fatty acids of the lipid were changed depending on the incubation temperature but hardly found a certain tendency except linoleic acid which was higher at lower temperature.
5. The total percentages of unsaturated fatty acids in the lipids were 50~60 % and comparatively higher at lower incubation temperature.

서 론

三大 영양소의 하나인 유지는 우리 식 생활에 대단히 중요할 뿐만 아니라 식품 가공업 및 유지 가공업과 기타 산업에서 그 수요가 대단히 많으나, 국내 유지 생산량은 그 소요량에 크게 못 미쳐 상당 부분을 수입에

의존하고 있으며 수입량도 매년 증가하고 있는 실정이다. 더우기 세계적인 자원난은 유지에도 미쳐 국제 유지 가격은 급격히 상승하고 있는 처지로 국내 자원 확보와 외화 절약이라는 의미에서 유지 자원 개발 및 확보는 시급하다. 그러나 식물성 유지는 한정된 경작 면적과 작물의 경제성 때문에 그 생산량이 단 시일내에 증가될 전망은 없으며 동물성 유지도 우리나라 축산 규모와 축산물 가격을 고려할 때 그 생산량이 소요량을 충당할 수 있기에는 현재로서 기대하기 어려운 실정이다.

이와같은 현황에서 일부 선진국에서는 미생물을 이용하여 값싼 자원으로 단백질을 생산하는 방법과 동일하게 미생물을 매체로 저렴한 원료로 부터 유지를 생산하기 위한 많은 연구가 수행되고 있다. 미생물이 유지를 생산할 수 있다는 사실은 19세기 말부터 알려졌으며[1] 藻類, 박테리아, 곰팡이 및 酵母등이 유지를 생산하는데 균종, 배양 기질의 조성, 배양 조건등에 따라서 유지 생산량 및 조성은 크게 차이가 난다. 일반적으로 박테리아가 생산하는 유지는 대부분이 독성이 있다고 알려져 있으며[2] 또한 균체의 비중이 낮아 생산성이 낮은 결점이 있기 때문에 기업적 견지에서 유지 생산 연구는 대부분 酵母와 곰팡이에 집중되고 있다. 그러나 酵母의 경우 균체 증식 속도는 빠르나 체내에 생성된 유지를 단단한 세포벽 때문에 추출하기가 힘들다는 결점이 있다[3,4].

따라서 본 연구에서는 비교적 균체 증식 속도가 빠르며 유지 추출이 용이하고 다당류의 분해 이용이 가능한 곰팡이를 대상으로, 유지 생산능이 우수한 균주를 수집 분리하였고 선발된 몇가지 균주의 배양 조건별 유지 생산 능 및 생산된 유지의 조성을 확인하였기로 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시험 균주

일차 시험하여[5] 균체내 유지 함량이 30% 이상되는 *Aspergillus terreus, Aspergillus ochraceus, Cladosporium fulvum* 및 N-1(未同定)을 시험 균주로 하였고 이를 YM slant에 접종하여 1~5°C 냉장고에 보관하면서 사용하였고 매 1개월마다 계대하였다.

사용 배지 및 배양

액체 배지를 사용하였고 그 조성은 Table 1과 같다. Table 1에 의하여 조제한 배지 50 *ml*를 250 *ml* 삼각 후라스크에 넣어 10 p.s.i.에서 10분간 살균 후 배양액으로 사용하였고, 이 배양액에 slant로 부터 각 균주를 1 spatula (ϕ 5 *mm*) 채취하여 접종하였다. 배양 온도는 20, 25 및 30°C로 하였으며 *Aspergillus* 속은 10일간, 기타 균종은 12일간 정치 배양하였다.

Table 1. Media composition

Sucrose	150.00 *g*	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5.00 *g*
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	7.30 *g*	K_2SO_4	0.44 *g*
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05 *g*	Urea*	1.69 *g*
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.16 *g*	Distilled water	Fill up to 1,000 *ml*
		Initial pH	3.5

* *Cl. fulvum*과 N-1은 질소 원으로 urea 대신 $NaNO_3$ 4.78 *g*을 사용

균체 회수 및 건조[6]

한 균주에 대하여 5개씩을 접종 배양시켰고 각각의 후라스크를 수증기압으로 10 p.s.i.에서 15분간 가열 처리한 다음 내용물을 실온까지 냉각시키고 여과하여 균체를 분리하였다.

분리된 균체는 곧바로 −30°C로 동결 건조하여 건조 균체를 얻었고 건조물의 무게를 평량하여 균체량으로 하였다.

지방 분석

가. 지방 함량 정량[7]

건조 균체 20 *g*을 클로로포름 100 *ml*와 무수 메탄올 200 *ml*에 혼합하여 Waring blender로 2분간 마쇄한 다음 클로로포름 100 *ml*를 첨가하고 다시 30초간 blending한 다음 이 혼액에 증류수 100 *ml*를 첨가하여 계속 30초간 blending하였다. 마쇄액을 Whatman No. 1 여과지로 Büchner 여두를 사용하여 여과하였고 감압하에 농축시켰다. 또 여과 잔사와 여과지를 50 *ml* 클로로포름으로 재 추출하여 원액에 합하고 이 여액을 분액 여두에 옮겨 부어 클로로포름 층을 분리하고 분리된 클로로포름 층에서 클로로포름을 증발 제거하여 얻어진 잔사의 양을 지방량으로 하였다.

나. 지질의 분획 정량

Iatroscan TH—10(Iatron Inc., Japan)을 이용하여 Chromarod-S (0.9 *mm*×190 *mm*)에 6 μg 정도의 지질 시료를 spotting하고 *n*-hexane : diethylether : acetic acid (80:20:1)의 용매로 전개하여 건조시킨 후 H_2 flow rate 160 *ml*/min, 공기 2,000 *ml*/min 조건하에서 수소 불꽃으로 전개 물질을 이온화 시킨 후 이를 감지 기록하여 크로마토그람을 얻었다.

내부 기준 물질(internal standard)로는 stearyl alcohol (Wako 社製)를 사용하였고 비교 표준 물질로는 lecithin (phospholipid), cholesterol (free sterol), linolenic acid (free fatty acid), triolein (triglyceride) 및 cholesterol palmitate (esterified sterol)를 사용하였

으며 표준 물질의 크로마토그람의 면적과 분석 시료의 면적을 대비하여 정량하였다.

다. 지방산 조성

0.05 *N* sodium methylate로 지방을 메틸化[8]한 후 Hitachi model 163 gas liquid chromatography에 의하여 지방산을 정량하였다. 컬럼은 stainless steel column(3 *m*×3 *mm*)으로서 충진 물질은 80~100 mesh Uniport B에 15% DEGS를 도포하여 사용하였고 column temp. 195°C, injection temp. 240°C, N_2 flow rate 45 *ml*/min, H_2 flow rate 35 *ml*/min, air flow rate 600 *ml*/min 조건에서 분석 정량하였다.

결과 및 고찰

배양 온도 별 균체 생산량 및 유지 함량

시험을 실시한 균주의 최적 온도를 확인하기 위한 온도 별 균체내 유지 함량 측정 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서와 같이 배양액 100 *ml* 당 생산된 균체량은 대체로 30°C까지 온도가 높아질 수록 증가하는 경향이며 *Cl. fulvum*과 *Asp. ochraceus*는 20°C와 30°C 배양에서 균체량에 큰 차이를 보이고 있다. 조 지방 함량은 *Cl. fulvum*이 25°C 배양에서 27.77%이고, *Asp. ochraceus*는 30°C에서 50.47%, *Asp. terreus*는 30°C에서 46.60%, N-1은 25°C에서 33.78%였는데 Singh등[6]의 실험 결과 *Cl. fulvum* 23.5%, *Asp. ochraceus* 47.5% 및 *Asp. terreus* 56.7%와 비교할 때 *Asp. terreus*를 제외하고는 높은 값이었다.

탄소 원을 기준으로 fat coefficient를 비교하여 보면 30°C에서 배양된 *Asp. terreus*가 13.01%로 가장 높은 수치를 보이고 있는데 이 결과는 *Asp. ochraceus*의 13.2[6]와는 거의 같은 수치이나 *Lipomyces starkeyi*의 10.3[9]보다는 높고 *Penicillium spinulosum*의 16.1[10]보다는 낮은 수치이다. fat coefficient도 균체량과 비슷하게 N-1만을 제외하고 30°C에서 모두 높은 경향을 나타내고 있다.

배양액의 액성은 배양 초 pH 3.5에서 pH 6~7로 상승하는 경향이나 *Asp. ochraceus*만은 큰 변화를 나타내지 않고 있다.

유지 조성

각 균주가 배양 온도 별로 생산한 유지의 조성을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 이 결과에서 보면 시험한 곰팡이류가 생산하는 유지의 주성분은 triglyceride라고 볼 수 있으며 온도에 따라서 어떤 뚜렷한 경향은 나타나지 않으나 *Asp. terreus*의 경우만은 배양 온도가 상승함에 따라 triglyceride의 함량이 높아지고 있다. 균종에 따라서 조성은 조금씩 차이가 나는데 *Cl. fulvum*의 경우 20°C 배양에서는 free fatty acid가 전혀 검출되지 않으나 25°C 및 30°C에서는 triglyceride 다음으로 그 함량이 높으며 *Asp. ochraceus*와 *Asp. tereus*의 경우는 phospholipid의 함량이 높다. Free sterol

Table 2. The final pH of media, content of dry felt and crude fat produced by molds on various temperature

Strain	Temp. (°C)	Final pH*	Dry felt/100 *ml* media (*g*)	Crude fat content(%)	Fat coefficient***
Cladosporium fulvum	20	6.4	1.53±0.46	17.05±2.76	2.81
	25	6.4	3.27±0.63	27.77±2.09	6.05
	30	6.3	3.77±0.30	27.50±1.61	6.92
Aspergillus ochraceus	20	4.0	1.17±0.10	38.57**	3.00
	25	4.2	2.02±0.66	41.53±1.66	5.58
	30	4.1	2.59±0.23	50.47±1.00	8.88
Aspergillus terreus	20	6.5	2.76±1.02	23.49**	4.32
	25	6.8	3.32±0.67	41.36±1.38	9.15
	30	6.8	4.19±0.25	46.60±1.59	13.01
N−1	20	7.1	3.33±0.72	18.04±3.09	4.00
	25	7.1	4.56±1.34	33.78**	10.28
	30	6.7	4.08±0.18	27.42±0.35	7.46

* Initial pH 3.5

** Mean value

*** The amount of fat expressed as % of sucrose supplied

의 함량은 N-1을 제외하고는 그 함량이 지극히 낮은 경향을 보이고 있다.

한편 *Pythium irregulare*[11]의 배양 조건 별 생산된 유지는 triglyceride가 70%이상을 차지하고 있으며 전체적으로 非極性 脂質이 주성분을 이루고 있다. Bhatia들[12]의 결과에 의하면 *Asp. niger*, *Asp. luchuensis Inui*등 7종의 곰팡이에 있어서도 배지의 질소 원에 따라 약간의 차이는 있지만 非極性 脂質이 50~80%정도 포함되어 있으며, 이 非極性 脂質은 triglyceride가 주성분을 이루고 있는 것은 본 시험 결과와도 일치하고 있다. *Chenouda*[13]의 연구 결과에 의하면 *Blakeslea trispora*의 착색 부분과 비 착색 세포벽의 주성분은 phospholipid와 遊離 脂肪酸으로서 phospholipid의 함량이 대단히 높으며 酵母류[14]에 있어서도 상당량의 phospholipid가 함유된 경우가 있고 *Mycrotorula japonica*[15]의 유지 조성은 탄소 원에 상관없이 phospholipid가 주종을 이루고 있으나 본 실험에서 시험한 균주가 생산하는 유지 중에는 phospholipid의 함량이 그렇게 높은편이 아니었다. 일반적으로 곰팡이에는 phospholipid의 함량이 그렇게 높은 것으로 나타나지 않고 있다[11].

유지의 지방산 조성

각 균주를 각 온도 별로 배양시켜 얻어진 유지의 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서 보는 바와 같이 *Cl. fulvum*, *Asp. ochraceus* 및 *Asp. terreus*가 생산하는 유지 중 가장 함량이 높은 지방산은 oleic acid이며 N-1에서는 linoleic acid로 나타났으며 주 지방산인 palmitic acid, stearic acid, oleic acid 및 linoleic acid의 양을 합하여 보면 N-1은 95% 정도이나 나머지는 98%이상으로 옥수수 기름, 면실유, 올리브유등과 같은 식물성 기름과 비슷한 경향이며 쇠기름이나 돼지 기름 보다는 높은 수치이다[16]. 따라서 주 지방산의 함량으로 비교하여 본 결과 이들 곰팡이가 생산하는 유지는 식물성 유지와 매우 비슷하였다.

한편 다른 곰팡이류의 지방산 조성과 비교하여 보면[12] palmitic acid, oleic acid, stearic acid 및 linoleic acid의 함량이 *Asp. niger* 94%, *Asp. luchuensis* 86.6%. *P. crustosum* 51.8%, *Alternaria tenius* 82%, *Rhizoctonia solani* 80.2%, *Mucor spp.* 81.9% 및 *Pythium irregulare* 51.8%등으로 비교적 낮은 함량을 나타내고 있는데, 질소원에 따라서 조성은 약간씩 변한다고 보고되어 있으며 *Fusarium oxysporum*의 경우도[17] 질소원 및 글루코오즈의 농도에 따라 지방의 조성이 달라진다고 보고되어 있다. 그러나 근본적으로 동물 지방 보다는 식물 지방에 비슷한 조성을 가지고 있다는 것은 본 실험의 결과와 비슷한 경향이다. 酵母의 경우도[14,18] palmitic acid, stearic acid, oleic acid 및 linoleic acid가 주성분을 이루고 있다.

한편 배양 온도에 따른 지방산 변화를 보면 균종에 따라 구성 비율이 약간씩 달라지나 일정한 경향은 발견할 수 없었고 linoleic acid만은 온도가 상승함에 따라 그 함량이 감소하는 경향을 나타내고 있다. 이와같은 사실은 Gerasimova등[19,20]의 결과와 일치하는 것으

Table 3. The components of total lipids produced by several mold strains on various temperature

Strain	Temp.	PL (Phospholipid)	FS (Free Sterol)	FFA (Free Fatty acid)	TG (Triglyceride)	ES (Esterified sterol)
Cladosporium fulvum	20	14.52±1.93	N.D.	N.D.	85.48±1.9	N.D.
	25	7.31±2.31	2.95±1.31	10.67±1.69	79.06±2.85	N.D.
	30	3.69±6.88	1.88±1.30	11.38±2.77	83.04±5.06	N.D.
Aspergillus ochraceus	20	6.87±1.49	N.D.	1.95±1.66	92.57±3.17	N.D.
	25	4.06±0.88	0.62±0.87	7. 5±1.30	87.81±1.8	N.D.
	30	10.11±1.48	N.D.	3.04±0.44	86.85±1.2	N.D.
Aspergillus terreus	20	10.51±3.13	2.87±1.20	1.91±1.31	84.71±3.88	N.D.
	25	4.44±2.15	N.D.	N.D.	95.56±2.15	N.D.
	30	3.01±1.74	N.D.	N.D.	96.90±1.74	N.D.
N−1	20	4.99±0.62	4.99±0.62	7.26±1.41	82.88±1.36	N.D.
	25	2.17±1.39	2.67±2.28	4.09±1.58	91.07±2.36	N.D.
	30	1.72±0.45	7.11±2.55	10.01±1.14	81.16±2.92	N.D.

N.D. : not detected

Table 4. The fatty acid composition of total lipids produced by several mold strains on various temperature

Strain	Temp (°C)	Fatty acids (%)								Sat'd	Un-sat'd
		C_{14}	$C_{14:1}$	C_{16}	$C_{16:1}$	C_{18}	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$		
Cladosporium fulvum	20	0.21	N.D.	27.22	Trace	10.56	42.21	19.03	0.27	38.49	61.51
	25	0.19	0.19	31.62	Trace	13.34	36.33	18.04	0.29	45.15	54.85
	30	0.31	0.42	31.26	Trace	13.42	40.83	13.32	0.44	44.99	55.01
Aspergillus ochraceus	20	0.21	0.05	25.19	Trace	15.42	38.96	20.02	0.15	40.82	59.18
	25	0.34	0.12	26.89	Trace	13.21	39.47	19.09	0.88	40.44	59.56
	30	0.46	0.20	34.84	Trace	14.02	31.48	18.92	0.08	49.32	50.68
Aspergillus terreus	20	0.59	0.17	28.78	Trace	10.16	37.56	22.09	0.65	39.53	60.47
	25	0.64	0.17	35.14	Trace	8.52	36.27	18.96	0.28	44.30	55.70
	30	0.58	0.06	29.30	Trace	10.67	44.61	14.48	0.30	40.55	59.45
N−1	20	0.49	N.D.	29.76	Trace	5.44	26.27	37.15	0.89	35.69	64.31
	25	0.27	N.D.	30.52	3.80	3.21	28.32	33.59	0.29	34.00	66.00
	30	0.43	N.D.	31.06	3.84	2.65	29.42	32.26	0.34	34.14	65.86

로서 *Cunninghamella elegans*와 *Blakesled trispora*등이 생산하는 유지에 있어서도 다른 지방산은 배양 온도에 따라 일정 경향을 찾기 어려웠으나 linoleic acid만은 배양 온도가 상승함에 따라 그 함량이 감소하고 있었다. 각 균주가 생산하는 유지 중 불포화 지방산의 비율은 *Cl. fulvum*, *Asp. ochraceus* 및 *Asp. terreus*가 50~60%, N-1은 65% 내외로 구성되어 있고 전체적으로 배양 온도가 낮아질 수록 불포화 지방산이 높아지는 경향이다.

이와 같은 불포화 지방산의 비율은 옥수수 기름 88%, 면실유 74%, 올리브유 88%, 대두유 82% 보다 상당히 낮으며[16] *Blakeslea trispora* 및 *Cunninghamella elegans*가 생산한 유지가 65% 및 75%[19]가 정도인데 비하여 약간 낮은 경향을 보이고 있다.

요 약

Cladosporium fulvum, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus* 및 N-1 균주를 탄소 원으로서 sucrose를 함유한 액체로 각각 20, 25 및 30°C에서 10~12일간 배양하여 균체를 얻고, 클로로포름—메탄올 혼합액을 이용하여 유지를 추출한 다음 추출된 유지에 대하여 몇가지 분석을 실시하였다. 이 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 배양액 100 *ml*당(sucrose 15 *g*함유) 최고 균체 생산량은 *Cl. fulvum* 3.82±0.30 *g*, *Asp. ochraceus* 2.62±0.23 *g*, *Asp. terreus* 4.24±0.25 *g*, N-1 4.62±0.18 *g*이었으며 조 지방 함량은 각각 27.50±1.61%, 50.47±1.00%, 46.60±1.59% 및 33.78%였다. 이들의 fat coefficient는 각각 6.92, 8.88, 13.01 및 10.28이었다.

2. 유지 생산량은 N-1만을 제외하고 30°C에서 최고량을 나타내었다.

3. 이들 균주가 생산하는 유지의 주 구성분은 triglyceride이며 그 다음 주성분은 *Cl. fulvum*과 N-1이 free fatty acid였으나 *Asp. ochraceus*와 *Asp. terreus*는 phospholipid였으며 기타 성분은 극히 적었다.

4. 이들 균주가 생산한 유지의 주 지방산은 *Cl. fulvum*, *Asp. ochraceus* 및 *Asp. terreus*의 경우 oleic acid, pamitic acid, linoleic acid, stearic acid의 함량 순서로 이루어졌고 주 지방산이 전체 지방산 함량의 98%이상을 차지하고 있으며, N-1은 linoleic acid, palmitic acid, oleic acid, stearic acid 순서로서 전체 지방산의 95%이상을 차지하였다.

5. 지방산 조성은 배양 온도에 따라 변화를 보이고 있으나 대부분 일정한 경향은 나타내지 않는데, linoleic acid만은 저온일 수록 함량이 높아졌다.

6. 불포화 지방산의 함량 비율은 50~66%였으며 저온에서 함량이 비교적 높은 경향이었다.

문 헌

1. Woodbine, M. : *Progress Ind. Microbiology*, **1**, 179 (1959)
2. Whiteworth, D. A. and Ratledge, C. : *Progress*

Biochemistry, **9**, 14 (1974)
3. Matile Ph., Moore, H. and Robinow, C. F. : *The Yeast*, vol. 1, Ed. by Rose, A. H. and Harrison, J. S., Academic Press Inc., New York, N.Y., p. 219~237 (1969)
4. Sugimori, T., Uchida, Y. and Tsukada, Y. : *Agr. Biol. Chem.*, **36**(4), 669 (1972)
5. 유진영, 신동화, 서기봉 : 식품 연구 사업 보고 (1978), 285~294 (1979)
6. Singh, J. and Sood, M. G. : *J. Sci. Food Agr.*, **23**, 1113 (1972)
7. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. : *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**(8), 911 (1959)
8. DeMan, J. M. : *J. Dairy Sci.*, **47**, 546 (1964)
9. Starkeyi, R. L. : *J. Bact.*, **51**, 33 (1946)
10. Khan, A. W. and Walker, T. L. : *Can. J. Microbiol.*, **7**, 895 (1961)
11. Bhatia, I. S., Raheja, R. K. and Sukhija, P. S. : *J. Sci. Food Agr.*, **24**, 779 (1973)
12. Bhatia, I. S., Raheja, R. K. and Chahal, D. S. : *J. Sci. Food Agr.*, **23**, 1197 (1972)
13. Chenouda, M. S. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 155 (1972)
14. Thorpe, R. F. and Ratledge, C. : *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 151 (1972)
15. Yamaguchi, K. and Kurosawa, M. : *Agr. Biol. Chem.*, **40**(4), 719 (1976)
16. 김동훈 : "식품 화학", 탐구당, p. 351 (1971)
17. Bhatia, I. S. and Arneja, J. S. : *J. Sci. Food Agr.*, **29**, 611 (1978)
18. Hunter, K. and Rose, A. H. : *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 639 (1972)
19. Gerasimova, N. M., Kiseleva, S. I. and Bekhtereva, M. N. : *Microbiology*, **42**(1), 24 (1973)
20. Enebo, L. and Iwamoto, H. : *Act. Chem. Scand.*, **20**(2), 439 (1966)