

生澱粉質原料의 Ethanol 醱酵에 있어서 高溫性酵母의 利用

朴允仲 · 孫天培* · 辛哲昇

(1984년 11월 26일 수리)

忠南大學校 農科大學 食品加工學科 *忠南大學校 理科大學 食品營養學科

Use of Thermophilic Yeast for Ethanol Fermentation of Raw Starchy Materials

Yoon-Joong Park, Cheon-Bae Sohn* and Cheol-Seung Shin

Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture, *Dept. of Food and
Nutrition, College of Sciences, Chungnam National University

Abstract

Effect of a thermophilic yeast (strain T-71) on the ethanol fermentation of raw starchy materials was investigated. The maximum temperature of the thermophilic yeast for the growing and fermentation was a little higher than that of ordinary yeasts and their resistance to ethanol was also high. Even though the optimum temperature of the thermophilic yeast for fermenting ethanol of several raw starchy materials was different depending upon the concentration of mashing, their optimum fermentation temperature was higher than the ordinary yeasts in all cases studied, and their fermentation efficiency was good enough to use. It was also found from the study that the period of fermentation could be shortened for about one to two days by using the thermophilic yeast.

緒 論

고구마, 옥수수, 보리 등의 澱粉質原料에서 ethanol을 生産하는 경우, 從來 原料는 糖化·醱酵에 앞서 高溫으로 蒸煮하지 않으면 안되었다. ethanol 生産에 있어서 原料蒸煮에 所要되는 energy量은 매우 크며 ethanol을 위한 總energy量의 約 30%라고 한다. 그러나 1973年 石油波動以來 世界各國에서는 石油代替 energy의 開發에 힘을 기울이게 되었으며 한편으로는 energy를 節約할 수 있

는 方法에 관한 研究도 하게 되었다.

近年 黑麴菌, *Rhizopus*屬菌에서 強力한 生澱粉糖化酵素의 生産이 알려지게 됨에 따라 生澱粉質 原料에서 ethanol을 生産하는 方法에 관한 研究도 活氣를 띠게 되었으며 生澱粉質原料의 ethanol醱酵의 工業化를 實現할 수 있게 되었다.

그러나 ethanol醱酵에 있어서는 보통酵母를 使用할 경우, 술덧(醪)의 溫度上昇을 抑制하기 위하여 醱酵tank를 冷却하는데 많은 energy를 消費하게 되며 또 安全하게 醱酵시키는데도 問題가 있다 이 問題를 解決하는데는 一般酵母의 경우 보다도

高溫에서 醱酵能을 나타내는 高溫性酵母의 使用이 바람직 하다.

生澱粉質原料의 ethanol醱酵에 관한 研究를 살펴보면 Ueda등¹⁾, Svendby등²⁾, Hayashida등³⁾, Matsumoto등⁴⁾, 裴등⁵⁾, 朴등⁶⁾,의 많은 報告가 있으며 高溫性酵母에 관한 研究로서는 Kumnuanta등⁷⁾, Sivipitayangoorn등⁸⁾, Supanwong등⁹⁾, 木場등¹⁰⁾의 報告가 있다.

그러나 高溫性酵母의 分離나 利用에 관한 研究는 아직 不充分하며 특히 生澱粉質原料의 ethanol醱酵에 있어서 高溫性酵母의 利用에 관한 研究는 찾아볼 수 없다. 따라서 筆者들은 優秀菌株로서 分離하여 保管중인 高溫性酵母의 特性을 살피고 이 酵母를 使用하여 生澱粉質原料의 ethanol醱酵에 관한 실험을 하여 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 供試菌株

高溫性酵母로서는 分離, 保管중인 T-71을 使用하였으며 對照菌株로서는 啤酒酵母(JI) 및 醱研 1號酵母(HG-1)를 使用하였다.

2. 生育最高溫度 試驗

1) 培地: 液體培地로서는 YM培地, 固體培地로서는 麥芽汁寒天斜面培地를 使用하였다.

2) 接種 및 培養: 供試地母를 液體培地에서 24時間 前培養한 後 이것을 固體培地 및 Durham管을 넣은 液體培地(所定溫度의 incubator에서 豫熱함)에 接種하고 5日間 培養하여 固體培地에서의 生育, 液體培地에서의 生育과 醱酵를 觀察하였다.

3. Ethanol 耐性試驗

糖度 10%의 麥芽汁, 無水 ethanol 및 酵母培養液 0.5ml를 混合하여 ethanol 濃度を 달리한 培地(混合培地量 10ml, ethanol濃度 3~15v/v%)를 만들고 培養試驗을 하였다. 卽 Durham管을 넣은 試驗管에 所定量의 麥芽汁을 分注하여 殺菌한 다음 所定量의 無水 ethanol을 加하고 이어서 酵母培養液(液體培地에서 供試酵母를 24時間 培養한 것) 0.5ml를 接種하여 所定溫度에서 2日間 培養한 後 觀察하였다.

4. 生澱粉質原料 및 醱酵試驗

1) 原料: 原料고구마로서는 Okinawa 100號를 使用하였으며, 生고구마는 水洗하여 鹽酸으로 pH2로

調整한 물에 3時間 浸漬하고 물기를 뺀 다음 Chopper(서울삼일 전기제작소)로 破碎하여 바로 담금에 使用하였고, 切干고구마는 3~5mm 두께로 썰어서 風乾한 것을 Cutting mill(Mitamura Reken Kogyo Co.)로 곱게 粉碎하여 使用하였다. 또한 보리는 大田市內 양곡상에서 구입한 쌀보리를 Cutting mill로 곱게 粉碎하여 使用하였다.

2) Koji(麴): 밀기울과 물을 같은 量 混合한 것 50g씩을 500ml들이 三角 flask에 넣어 殺菌한 것에 本 實驗室 保存菌株中 生澱粉糖化力이 강한 *Aspergillus usamii*의 變異株를 接種하고 30°C에서 2日間 培養한 것을 風乾하여 使用하였다.

Koji의 生澱粉糖化力은 1/10M 酢酸系緩衝液(pH 3.5)을 含有하는 1% 生육수수澱粉懸濁液에 酵素液 1ml를 加하여 30°C에서 60分間 反應시킨 後 DNS法^{11,12)}으로 生成糖量을 測定하고 그것에서 換算하여 60分間에 koji 1g에 의하여 生成되는 glucose의 mg數로 表示하였는데 使用된 koji의 生澱粉糖化力은 26單位였다.

3) 酵母 starter: 100ml들이 三角 flask에 糖度 10%의 麥芽汁培地를 60ml씩 分注하고 加壓 殺菌한 다음 試驗管寒天斜面培養酵母를 各 一白金耳씩 接種하여 30°C, 2日間 培養한 것을 使用하였다.

4) 담금의 原料配合: 原料配合는 Table 1과 같이 하였으며 300ml들이 三角 flask에 넣어 混合하였다. 原料에 알맞는 koji 添加量을 알아보기 위하여 0.5~8g의 範圍로 그 添加量을 달리하여 醱酵能을 試驗한 結果 3g以上에서는 큰 差異가 없었으므로 本 試驗에는 各各 4g씩을 使用하였다. 또한 담금술덧의 초기 pH는 koji의 生澱粉糖化酵素 活性과 雜菌汚染의 抑制를 考慮하여 pH 3.5로 調整하였다.

5) 醱酵술덧의 分析: pH, 酸度, ethanol 濃度(v/v%)는 常法으로 測定하였으며, 醱酵率¹³⁾은 다음 式에 의하여 求하였다.

$$\text{醱酵率}(\%) = \frac{\text{熟成술덧의 容量(ml)} \times \text{熟成술덧의 alcohol}(\%)}{\text{담금술덧의 容量(ml)} \times \text{담금술덧의 總糖}(\%) \times 0.6439} \times 100$$

6) 醱酵能 試驗: 300ml들이 三角 flask에 所定原料를 配合하여 담금하고 염화칼슘飽和溶液을 넣은 醱酵栓을 附着하여 醱酵시키면서 經時的으로 무게를 測定하여 炭酸 gas 放出量을 測定하고 이것에 의하여 醱酵能을 나타내었다.

Table 1. Mash preparation

Materials	Mash		
	A	B	C
Crushed raw sweet potato(g)	100		
Raw sweet potato flour (g)		50	
Raw barley flour (g)			50
Tap water (ml)	50	140	120
Koji* (g)	4	4	4
Starter**(ml)	10	10	10
pH***	3.5	3.5	3.5

*Raw starch saccharifying activity of Koji: 26 units/g Koji

Amounts of Koji on fermentation: fermentation ability same approximately, using Koji of 3~8g in each mash.

**Yeast starter: cultured in malt extract for two days at 30°C.

Yeast strains used: T-71 (thermophilic yeast isolated), JI, HG-1.

***pH: adjusted with 2N-HCl to pH 3.5.

結果 및 考察

1. 生育과 醱酵의 最高溫度

YM 液體培地和 麥芽汁固體培地에서 所定溫度別로 5日間 培養하여 生育과 醱酵能을 觀察한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Growth and fermentation temperature of various yeast strains on malt agar and in YM broth.

Strains	Medium	Temperature (°C)			
		40	41	42	43
T-71	liquid	+, F	+, F	+, F	-
	solid	+	+	+	-
JI	liquid	+, F	-	-	-
	solid	++	-	-	-
HG-1	liquid	+, F	-	-	-
	solid	-	-	-	-

+, groth; F, fermentation

Table에서 보는 바와 같이 對照菌株인 啤釀母 (JI)와 醱研1號酵母(HG-1)는 生育과 醱酵의 最高溫度가 40°C 이었으나 高溫性酵母로서 分離한 T-71菌株는 42°C에서 生育하고 醱酵도 하였으며, ethanol醱酵에 使用하는 普通酵母보다 溫度耐性이 큼을 알 수 있었다.

2. Ethanol耐性

Ethanol을 含有하는 培地에서 所定溫度別로 2日間 培養하면서 醱酵能을 觀察한 結果는 Table 3과 같다.

Table에서 보는 바와 같이 30~40°C의 範圍에서 高溫性酵母 T-71은 對照酵母에 比하여 보다 높은 ethanol濃度에서 醱酵能을 나타내어 ethanol耐性이 強함을 알 수 있었으며 또 어느 菌株의 경우

Table 3. Fermentation ability of various yeast strains in malt extract broth containing ethanol.

Temp. (°C)	Strains	Ethanol concentration(v/v%)						
		3	5	7	9	11	13	15
30	T-71	++	++	++	++	++	++	-
	JI	++	++	++	++	++	+	-
	HG-1	++	++	++	++	++	-	-
35	T-71	++	++	++	++	+	-	-
	JI	++	++	++	++	-	-	-
	HG-1	++	++	++	+	-	-	-
40	T-71	++	++	++	+	-	-	-
	JI	++	++	+	-	-	-	-
	HG-1	++	++	-	-	-	-	-

Fermentation ability after two days: +, weak fermentation ++, fermentation.

Medium: Solution mixed with malt extract broth of 10% and ethanol.

Inoculation: added preculture solution of 0.5ml to medium of 9.5ml.

Table 4. Analysis of fermented mash using crushed raw sweet potato for five days.

Temp. (°C)	Strains	Ethanol (v/v%)	pH	Acidity	Fermentation efficiency
30	T-71	8.6	3.8	6.1	80.0
	JI	9.0	3.9	5.5	83.8
	HG-1	8.9	4.0	4.6	82.9
35	T-71	9.6	4.1	5.0	89.4
	JI	9.6	4.1	5.1	89.4
	HG-1	9.4	4.1	5.0	87.5
37	T-71	9.6	4.2	5.4	89.4
	JI	9.0	4.0	5.5	83.8
	HG-1	7.5	4.0	5.5	69.8
40	T-71	9.5	4.0	6.0	88.4
	JI	7.1	3.9	6.2	66.1
	HG-1	5.7	3.9	6.3	53.1

Table 5. Analysis of fermented mash using raw sweet potato flour for five days.

Temp. (°C)	Strains	Ethanol (v/v%)	pH	Acidity	Fermentation efficiency
30	T-71	12.6	4.2	5.8	91.8
	JI	12.7	4.2	6.4	92.6
	HG-1	12.7	4.4	5.2	92.6
35	T-71	12.8	4.2	6.7	93.3
	JI	12.2	4.1	7.6	88.9
	HG-1	11.2	4.1	6.4	81.6
37	T-71	12.4	4.0	8.2	90.4
	JI	10.7	4.0	7.2	78.0
	HG-1	8.6	3.9	7.3	62.7
40	T-71	10.4	3.9	8.5	75.8
	JI	7.6	3.9	7.6	55.4
	HG-1	7.0	3.8	7.6	54.1

나 高溫일수록 ethanol耐性이 弱해졌다.

3. 醱酵술덧의 分析

澱粉質原料를 달리하여 담금하고 醱酵溫度를 달리하여 5日間 醱酵시킨 後 술덧을 分析한 結果는 Table 4~6과 같다.

破碎生고구마를 原料로 할때는 Table 4와 같이 對照酵母 JI 및 HG-1의 경우 35°C에서 ethanol 生成量이 가장 많았고 醱酵率도 높았으나 37°C 및 40°C 醱酵에서는 ethanol의 生成量이 떨어지고 醱酵率도 낮아졌다. 그러나 高溫性酵母 T-71의 경우는 35°C 및 37°C에서 ethanol 生成량과 醱酵率이 가장 높았으며 40°C에서도 약간 떨어졌을 뿐이었다. 따라서 破碎生고구마를 原料로 할때 分離한

高溫性酵母는 一般酵母에 比하여 보다 高溫에서 效率的으로 利用될 수 있다고 생각된다.

切干고구마가루를 原料로 할때는 Table 5에서 보는 바와 같이 對照菌株는 30°C의 醱酵술덧에서 ethanol 生成量 및 醱酵率이 各各 12.7%, 92.6%로 가장 높았고 35°C 以上에서는 점차 떨어지는 傾向을 보였으나 高溫性酵母의 경우는 30°C醱酵보다는 35°C醱酵에서 ethanol 生成量이나 醱酵率이 더 높았고 그 以上의 溫度에서는 떨어지는 結果를 보였다.

그러나 切干 生고구마가루를 原料로 한 담금條件에서는 破碎生고구마를 原料로 한 경우에 比하여 高溫性酵母와 對照酵母의 어느 경우나 醱酵適

Table 6. Analysis of fermented mash using raw barley flour for five days.

Temp. (°C)	Strains	Ethanol (v/v%)	pH	Acidity	Fermentation efficiency
27	T-71	12.4	4.2	6.3	79.4
	J1	12.8	4.1	6.1	81.9
	HG-1	12.5	4.0	6.4	80.0
30	T-71	13.2	4.4	5.7	84.5
	J1	13.1	4.1	7.5	83.2
	HG-1	13.0	4.0	6.4	83.8
35	T-71	14.0	4.4	6.9	89.7
	J1	11.8	4.3	6.4	75.5
	HG-1	11.6	4.2	7.3	74.2
37	T-71	13.4	4.3	7.0	86.7
	J1	8.9	4.3	6.1	57.0
	HG-1	7.6	4.3	8.1	48.8

溫이 낮아졌는 데 이것은 切干고구마가루의 경우에는 당분濃도가 높아 ethanol의 生成量이 많아지고 醱酵에 미치는 ethanol의 阻害作用이 그만큼 커졌기 때문이라고 생각된다. 醱酵과 ethanol濃도와 의 關係는 Brown등¹⁴⁾의 報告에서 살펴볼 수 있다.

生보리가루 原料로 한 경우에는 Table 6에 表示한 바와 같이 對照菌株에서는 30°C 醱酵에서 ethanol 生成量과 醱酵率이 가장 높았으나 高溫性酵母 T-71에서는 醱酵適溫이 35°C였으며 切干고구

마가루를 原料로 한 경우와 비슷한 結果를 보였다.

4. 醱酵能試驗

各 澱粉質原料의 醱酵試驗에 있어서 高溫性酵母와 對照酵母의 各最適醱酵溫度에서의 醱酵能을 나타낸 結果는 Fig. 1~3과 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 破碎生고구마를 原料로 할 때에는 高溫性酵母 T-71을 使用하여 最適溫度 (37°C)에서 醱酵시킨 경우 約 3日後에 炭酸 gas의 發生量이 거의 最高에 達하였으나 對照菌株인 淸酵母와 醱研1號酵母를 使用하여 最適溫度 (35°C)에서 醱酵시킨 경우는 4日 後에 最高에 이

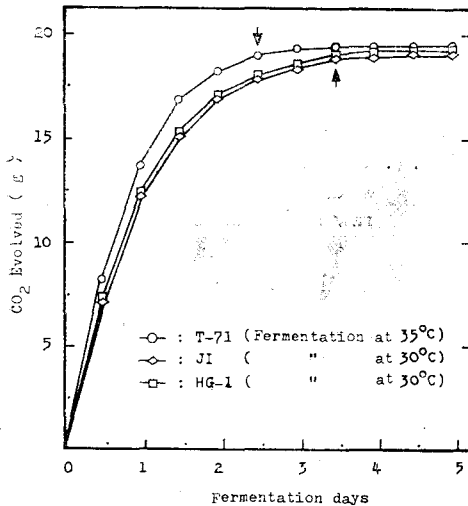


Fig. 1. Fermentation test at each optimum temperature of various yeast strains in mash with crushed raw sweet potato.

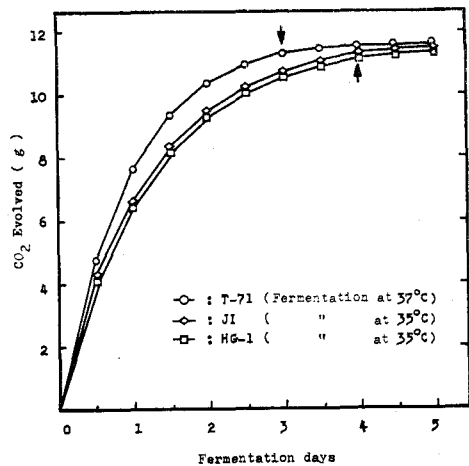


Fig. 2. Fermentation test at each optimum temperature of various yeast strains in mash with raw sweet potato flour.

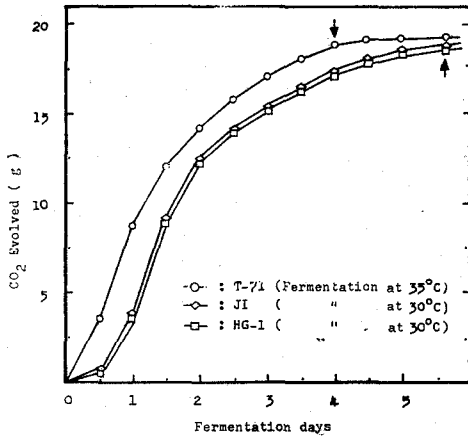


Fig. 3. Fermentation test at each optimum temperature of various yeast strains in mash with raw barley flour.

르렀다. 본 결과로 볼때 高溫性酵母를 使用하면 一般酵母의 경우에 比하여 醱酵期間을 1日程度 短縮시킬 수 있음을 알수 있다.

切干고구마가루를 原料로 할때는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 高溫性酵母 T-71을 使用하여 最適溫度 (35°C)에서 醱酵시킨 경우 對照酵母를 使用하여 最適溫度 (30°C)에서 醱酵시킨 경우보다 醱酵期間을 1日程度 短縮시킬 수 있었다.

한편 生보리가가루를 原料로 한 경우에는 Fig. 3에서 表示한 바와 같이 高溫性酵母 T-71을 使用하여 最適溫度 (35°C)에서 醱酵시켰을 때 初期부터 炭酸 gas의 發生이 많아 約 4日 後에 醱酵가 終了 되었으나 對照酵母를 使用하여 最適溫度(30°C)에서 醱酵시킨 경우는 醱酵 約 6日 後에 醱酵가 終了되는 傾向이었다.

以上の 結果로 미루어 볼때 生澱粉質原料와 담금濃度에 따라 多少 差異가 있었으나 高溫性酵母를 使用할 경우에는 一般酵母를 使用할 경우보다 醱酵期間을 1~2日程度 短縮할 수 있어 有利하다고 생각되는 데 本 試驗의 結果는 木場等¹⁰⁾의 報告와 合致되었다.

5. 高溫性酵母의 醱酵溫度에 따른 醱酵能

各澱粉質原料의 醱酵能試驗에 있어서 高溫性酵母 T-71을 使用하여 各 醱酵溫度에서의 醱酵能을 나타낸 結果는 Fig. 4~6과 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 破碎生고구마를 原料로 한 경우 炭酸 gas의 放出量으로 보아 35°C 및 37°C로 醱酵시킨 때 가장 좋은 結果를 보였다.

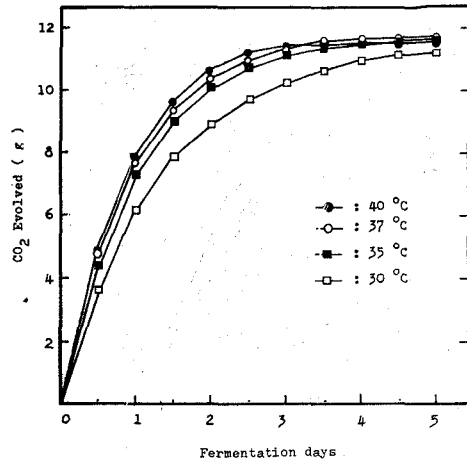


Fig. 4. Fermentation ability of T-71 strain at different temperature in mash using crushed raw sweet potato.

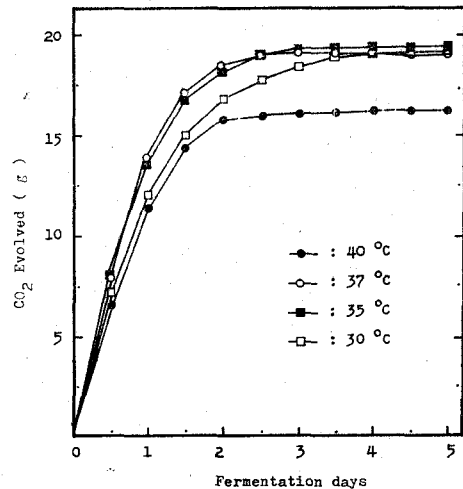


Fig. 5. Fermentation ability of T-71 strain at different temperature in mash using raw sweet potato flour.

40°C로 醱酵시킨 때는 약 3日 後에 炭酸 gas放出量이 最高에 達하였으나 그後는 醱酵가 中止되어 總炭酸 gas의 放出量은 35°C 및 37°C의 경우보다 약간 떨어지는 結果를 보였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 切干 生고구마가루를 原料로 한 경우에는 35°C로 醱酵시킬 때 炭酸 gas發生量이 가장 많았으며 37°C는 약간 떨어지는 傾向이었다. 40°C로 醱酵시킨 때는 醱酵 約 2日 後에 醱酵가 中止되는 結果를 보였는데 이와같은 結果는 高濃度담금에서 生成된 ethanol量과 高溫이

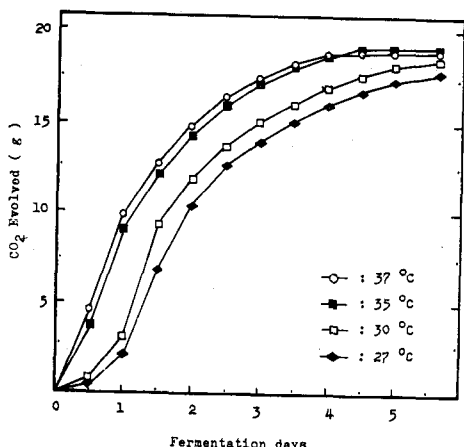


Fig. 6. Fermentation ability of T-71 strain at different temperature in mash using raw barley flour.

相乘의으로 酵母에 阻害作用을 하기 때문이라고 생각된다.

Fig. 6에 表示한 바와 같이 생보리가루를 原料로 한 경우도 切干고구마를 사용한 경우와 같이 35°C 醱酵에서 炭酸 gas의 發生量이 가장 많았으며 37°C에서는 약간 떨어지는 結果를 보였다.

6. 恒溫器溫度와 醱酵술덧의 溫度

醱酵試驗에 있어서 恒溫器溫度는 所定溫度에 어느 範圍內에서 調節할 수 있었으나 試驗하는 술덧(醪)의 溫度는 醱酵全期間을 通하여 一定하게 維持하기가 어려워 술덧중에 體溫計를 넣어 술덧 溫度를 測定하였다. 醱酵試驗에 있어 恒溫器溫度와 술덧溫度와의 關係를 測定한 結果는 Table 7과 같다.

Table에서 보는 바와 같이 定溫器는 試驗코자 하는 所定溫度에 ±0.5°C 範圍內에서 調整되었으나 술덧溫度는 一時的이긴 하나 醱酵最盛期에 所定溫度보다 3°C 內外까지 높아졌는 데 이러한 事

Table 7. Incubation temperature and maximum temperature of fermentation mash using T-71 strain.

Test temp. (°C)	Actual temp. of incubator (°C)	Mash max. temp. (°C)		
		crushed sweet potato	barley flour	sweet potato flour
30	29.6~30.0	32.3	33.7	33.8
35	34.8~35.4	36.8	37.2	37.7
37	37.0~37.5	40.1	40.6	40.3
40	40.0~40.4	41.5	—	41.1

實은 實際應用에 있어서 參考로 해야할 것으로 생각된다.

要 約

生澱粉質原料를 使用하는 ethanol醱酵에 있어서 高溫性酵母의 使用效果를 試驗하기 위하여 分離, 保存中인 高溫性酵母(T-71菌株)의 生育溫度, ethanol 耐性등의 特性을 調査하고, 몇가지 生澱粉質原料를 使用한 醱酵試驗을 實施하였다.

高溫性酵母 T-71의 生育 및 醱酵最高溫度는 42°C이며, 對照菌株보다 2°C 이상 높았으며 ethanol含有培地에 酵母菌體를 接種하여 醱酵能을 檢討한 바 T-71菌株는 對照菌株보다 ethanol 耐性이 컸다.

T-71菌株의 醱酵最適溫度는 술덧의 種類와 담금 濃度에 따라 달라지나 어느 경우나 對照菌株에 비하여 最適醱酵溫度가 높았다. 試驗菌株를 各各의 最適溫度에서 醱酵시킬 때 高溫性酵母 T-17을 使用한 경우는 對照菌株의 경우에 비하여 醱酵期間을 1~2日間 短縮시킬 수 있었다.

切干生고구마술덧에서 T-71菌株의 最適醱酵溫度는 35~37°C(生成 ethanol濃度 9.6% 條件)이며 40°C에서도 別차이가 없었으나, 보리가루술덧과 질간고구마가루술덧에서 T-71菌株의 最適醱酵溫度는 各各 35°C(各 生成 ethanol 濃度 14.0% 및 12.8%條件)이었다.

參 考 文 獻

1. Ueda, S. and Koba, Y.: J. Ferment. Technol., 56 : 237~242(1980).
2. Svendby, O., Kakutani, K., Matsumura, Y., Iizuka, M. and Yamamoto, T.: J. Ferment.

- Technol., 59 : 485~487(1981).
3. Hayashida, S., Ohta, K., Flor, P.Q., Hanri, N. and Miyahara, I.: Agric. Biol. Chem., 46 : 1947~1950(1982).
 4. Matsumoto, N., Fukushi, O., Miyanaga, M., Kakihara, K., Nakajima, E. and Yoshizumi, H.: Agric. Biol. Chem., 46 : 1549~1558(1982).
 5. 裴 武, 李在汶: 韓國産業微生物學會誌, 11 : 181~185(1983).
 6. 朴官和, 吳秉夏, 李啓瑚: 韓國農化學會誌, 27 : 52~54(1984).
 7. Kumnuanta, J., Punpeng, B. and Komagata, K.: Ann. Rep. of ICME, 2 : 307(1979).
 8. Sivipitayangoorn, S. and Ueda, S.: Ann. Rep. of ICME, 4 : 370~372(1981).
 9. Supanwong, K., Ohta, K., Hayashida, S.: Ann. Rep. of ICME, 4 : 335~336(1981).
 10. 木場洋次郎, 上田誠之助: 日本醸造協會誌, 75 : 858~861(1980).
 11. 福井 作藏: 還元糖の定量法, 19~20, 學會出版センター, 東京(1978).
 12. Pesez, M. and Bartos, J.: Colorimetric and fluorimetric analysis of organic compound and drugs, 407, Marcel Dekker Inc., New York(1974).
 13. 大沼 正吉: 發酵工業用語辭典, 73, 東京(1968).
 14. Brown, S.W., Oliver, S.G., Harrison, D.E. F. and Righelato, R.C.: Eur. J. Appl. Microbiol., Biotechnol., 11 : 151~155(1981).