

## Hollow Fiber Recycle Reactor 를 이용한 알콜연속 발효

이시경 · 박경호 · 백운화 · 장호남\*

두산연구소 \*KAIST 화학공학과  
(1986년 3월 5일 수리)

### Continuous Alcohol Fermentation by Cell Recycling Using Hollow Fiber Recycle Reactor

Si Kyung Lee, Kyung Ho Park, Un Hua Pek, Ho Nam Chang\*

Doo San Research Laboratory, Yoido P. O. BOX 80, Seoul, Korea

\*Dept. of Chemical Engineering, KAIST, Seoul, Korea.

(Received March 5, 1986)

---

Improvement of productivity in ethanol fermentation was attempted using a hollow fiber bioreactor (HFR) where *Saccharomyces cerevisiac var. ellipsoideus* cells were recycled to achieve a high yeast concentration. Industrial wort was used as the fermentation media without supplying any additional nutrients. The performances in hollow fiber recycle reactor (HFR) were compared with those of batch and continuous cultures. In a continuous culture with 11°P and 15°P wort media final ethanol concentrations were 4.71% and 5.82% (v/v) and yields 86.2% and 78.6% respectively when the dilution rate (D) was 0.1 h<sup>-1</sup>. In contrast, the ethanol concentration and productivity in HFR were 7.64%(v/v) and 6.1g/l/h at D=0.1h<sup>-1</sup> with 15°P media. When the dilution rate was increased to 0.2 h<sup>-1</sup>, the concentration and the productivity were 7.62% (v/v) and 12.2g/l/h. At D= 0.3h<sup>-1</sup> the sugar was completely consumed and the productivity was 18.1g/l/h. This corresponds to 4 times that in the continuous system and 16.3 times that in the batch system performed in comparable conditions.

---

세계적으로 석유자원의 공급이 불안정함에 따라 화학원료와 에너지로 사용하기 위해 새로운 탄화수소원이 개발되고 있다. 브라질등<sup>(1)</sup>의 몇 나라에서는 사탕수수 카사바등과 같은 농산물로 부터 에탄올을 발효하여 공업적으로 생산하기 위한 연구를 계속적으로 진행하여 왔으며, 가스홀로서 실용화되고 있다.

지금까지 에탄올 산업에서 가장 큰 문제점은 증류를 위한 에너지 비용과 낮은 발효속도에 따른 발효조의 크기가 커야한다는 점이다. 발효속도를 빨리하여 고농도의 당에서 고농도의 에탄올을 생산하면 발효조의 크기감소와 에너지 절약은 얻어질 수 있다. 그러나 연속발효시 에탄올 생산은 생산물인 에탄올의 발효진행에 대한 억제현상(Inhibition) 과 Wash-out 에 의한 낮은 균체농도등에 의하여 제한을 받는다. 또한 에탄올 억제현상을 줄이기 위해서

는 생산물을 발효조에서 계속 제거해 주어야 하는데, 생성된 에탄올을 낮게해줄 목적으로 진공발효등이 실시되었다<sup>(2)</sup>.

생산성의 증가는 연속발효의 가장 큰 잇점중의 하나이다<sup>(3)</sup>. 이로부터 연속발효에서의 원심분리법에 의한 균체순환과 K-carrageenan, Alginates등과 같은 polymer gels로 고정시켜 반응관 또는 유동층 반응계 system 을 이용하는 방법등이 연구되어 왔다<sup>(4,5)</sup>. 최근에는 일본 기린맥주, 협화발효에서 고정화세포반응기를 이용한 시험공장규모로 진행되었다<sup>(6)</sup>. 한편 HFR(Hollow Fiber Reactor)에 관하여는 균체순환에 의한 균체회수<sup>(7)</sup>와 반응기의 역할로서 Urocanic acid 생산<sup>(8)</sup> 및 invertase 를 이용한 Fructose 생산<sup>(9)</sup>에 관한 연구가 진행되어 왔다. 또한 HFR 에 의한 균체순환을 통한 에탄올 발효등<sup>(10,11)</sup>이 있으나 이의 연구는 전부 포도당을 발효원료로

사용하고 있다.

이에 본 연구는 산업용 맥주원료인 맥즙을 이용하여 연속배양법에 HFR을 연결 균체를 순환시키면서 어느정도 까지 생산성을 올릴 수 있을까 하는 것과 에탄올을 발효시 회분식과 연속발효 및 HFR을 이용한 연속발효의 특성을 비교검토 하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구소에 보관중인 *Sacch. cerevisiae, steinberg*, *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus*, *Sacch. carlsbergensis*, E<sub>1</sub>. 3 균주를 YPD media slant에 보관하면서 실험 균주로 사용하였다.

사용배지

동양맥주(주) 서울공장의 맥주제조 원료인 맥즙(Wort)을 이용하여 Fig. 1의 절차에 따라 제조한 후 당도를 조절하여 배지로 사용하였다.

Wort→Heating(100℃, 20 min.)→Cooling→  
Filtering→Heating (protein 제거)→Cooling→  
Filtering→당도조절

Fig. 1. Preparation of wort media.

사용기기

- Fermenter 5L용 (Eyela Jar Fermenter, Tokyo Rikakikai Co. Japan)
- Density meter (DAM 60 System, Anton Paar, Austria)
- Hollow Fiber Reactor (HIMPO1-43, Amicon, U. S. A)
- Spectrophotometer (555 UV-VIS, Perkin-Elmer, U. S. A)
- Peristaltic pump (Model No. 7576-10, Cole Parmer, U. S. A)

Seed culture

맥즙배지 120ml를 300ml 삼각 플라스크에 취해 멸균 냉각시킨후 YPD slant에 보관된 각 균주를 1~2 백금이씩 접종하여 shaker(100 stroke/min)에 넣고 30℃에서 24시간 진탕배양 하였다.

삼각플라스크 배양

맥즙배지 120ml를 분주한 300ml 삼각플라스크를 멸균 냉각후 각 종균 10ml를 무균적으로 접종하여 진탕기(100 stroke/min. 30℃)에서 3일간 배양시키면서 24시간 간격으로 시료를 취해 분석하였다.

Jar Fermenter배양(연속 배양)

맥즙배지 1.2~1.8L를 Jar에 넣은 후 Autoclave

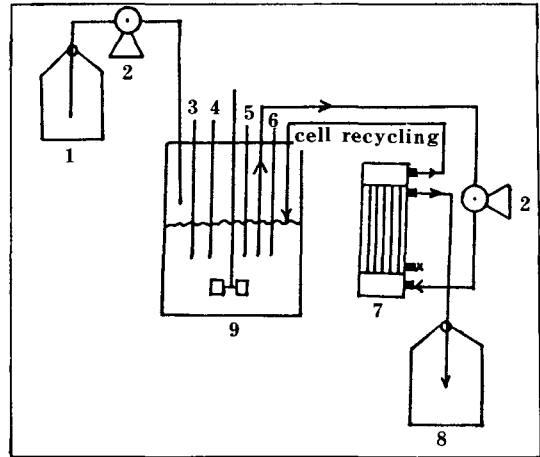


Fig. 2. Schematic diagram of continuous fermenter with HFR.

- |                     |                      |
|---------------------|----------------------|
| 1. Medium reservoir | 6. Heater            |
| 2. Peristaltic pump | 7. HFR               |
| 3. pH probe         | 8. Product reservoir |
| 4. Thermometer      | 9. Fermenter         |
| 5. Sampler          |                      |

(121℃, 20min.)에서 멸균시킨후 냉각시킨다. 미리 배양된 종균 100ml를 발효조의 주입구를 통해 접종시켜 30℃에서 배양시켰다(100 rpm). 24~48 시간 배양후 용동성펌프로 Flow rate를 조절하여 멸균 배지를 공급하면서 연속발효를 실시하였다.

HFR부착 연속발효

배양과정은 위와 같으나 Fig. 2에서 보는 바와같이 발효조에 HFR을 부착시켜 Peristaltic pump의 유속을 800ml/min로 유지시키면서 균체를 발효조에 순환시켰다. 이때 또하나의 용동성펌프를 조절하여 희석율별로 주입량을 결정한 후 멸균배지를 공급하면서 일정시간 간격으로 시료를 분석하였다.

알콜측정<sup>(12)</sup>

발효액 50 ml를 취해 상법에 따라 증류한 후 탁도측정기를 사용하여 20℃에서 비중을 측정하여 그 함량을 환산하였다.

당도측정

알콜을 증류하고 남은 여액에 증류수를 가해 50ml로 맞춘후 이의 당도를 위와 같은 방법으로 구하여 Real Extract (°P; plato)로 표시하였다.

균체량 측정

배양액을 증류수로 희석하여 광도계로 660nm에서의 O.D값을 측정하였다. 즉 각 O.D값을 갖는 균체 현탁액의 무게를 평량한 후 O.D값과 건조균체량과의 표준곡선을 작성하여 측정된 O.D값으로 시료의 건조 균체량을 구하였다.

**생균수 측정<sup>(13)</sup>**

증류수 100 ml에 1g의 Crystal violet 과 2g의 trisodiumcitrate dihydrate를 가하여 제조한 후 배양액과 1 : 1로 희석하여 hemacytometer를 사용하여 측정하였다.

**발효율 (Yield)**

당과 알콜을 측정한 후 초기당도에서 비발효성당을 빼고 이로 부터 다음식에 의하여 계산하였다.

발효율 =

$$\frac{\text{배양액중의 알콜 \% (w/v)}}{\text{초기배양액의 당함량 (°P)} \times 0.5114} \times 100$$

**결과 및 고찰**

**각 균주의 알콜생산**

연속발효 공정에 이용할 알콜생성능이 우수한 균주를 선택하고자 천연맥즙 배지상에서 실시한 실험의 결과는 Fig. 3 과 같다.

이상의 실험에서 효모에 의한 알콜생산은 E, type yeast와 *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus*가 각각 발효 3 일째 15°P media를 사용한 경우 6.82% 및 6.52% (v/v), 20°P media인 경우 9.26% 와 9.87% (v/v)로 *Sacch. cerevisiae, steinberg* 균주보다 높게 나타났다. 특히 *steinberg* 균주는 발효율이 낮아 74~80% 정도이었다. 이는 *steinberg* 균주가 포도주 생산균주로서 배지조성이 원인인 것으로 생각된다. 그러나 E, type yeast와 *Sacch. cerevisiae*

*var. ellipsoideus* 균주는 알콜함량이 거의 같은 수준이었으나, *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus*가 20°P media에서 알콜함량이 다소높아 9.87% (v/v) 이었다. 따라서 계속되는 연속발효 및 HFR 연속발효 실험에서는 향이 좋은 균주로 알려진 *Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus*를 택하여 사용하였다.

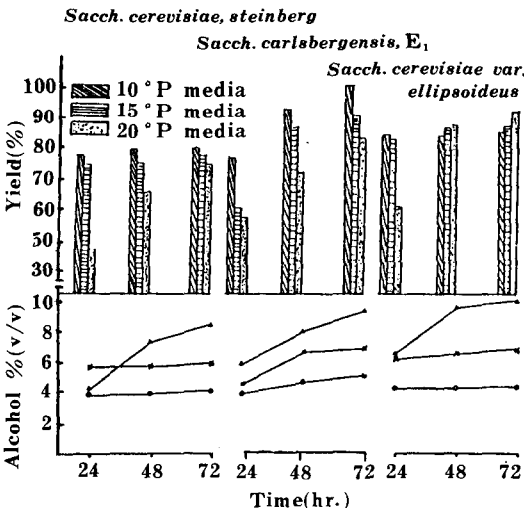
**연속발효 실험결과 및 고찰**

위에서 선별된 균주로 Jar Fermenter를 이용하여 24~48 시간 동안 회분식 발효를 실시 하였으며, 그후 연속발효를 실시하여 알콜함량, 발효율 및 생산성을 조사한 결과는 Table 1 및 2 와 같다.

Table 2에서 보는 바와같이 회분식의 경우 발효 48시간에 알콜농도 6.81% (v/v) 이었으며 이때의 발효율은 92.2%이었다. 한편 연속발효에서 회석율이 0.1h<sup>-1</sup>일때 11°P media 및 15°P media를 이용한 실험결과 알콜 농도는 4.71% 및 5.82% (v/v)로 가장 높았으며 이때의 발효율은 각각 86.2% 및 78.6% 이었다.

본 실험에서는 Dilution rate를 0.1h<sup>-1</sup> 이상 올릴 경우 의미가 없는 것으로 생각된다. 그 이유는 Dilution rate를 올릴때 균체가 유출되어 나가는 소위 Wash out 현상으로 생산성은 다소 증가될지 모르나 발효조내의 최종 알콜농도 및 발효율이 낮아지기 때문이다.

Ghose등<sup>(14)</sup>은 *Sacch. cerevisiae* 균주를 사용한 연속발효 실험에서 ethanol 농도가 33g/l 이었으며 생산성은 4.1g/l/h라고 보고하였는데 이는 본실험의 결과와 유사하였다. 한편 Rogers등<sup>(11)</sup>은 *Zymomonas mobilis* 균주를 사용한 실험에서 생산성이 8.0~12.0g/l/h라고 보고하였다. 이와같이 알콜의 농도 및 생산성등은 사용하는 균주와 배지농도에 따라 크게 영향을 받는 것으로 생각된다.



**Fig. 3. Alcohol Production by different yeasts cultured in the media containing various sugar contents.**

○-○ 10°P media, ×-× 15°P media, △-△ 20°P media

**Table 1. Continuous alc. ferment. without cell recycle at 11°P media.**

Process	Time (hr)	Extract (°P)	Ethanol (v/v%, w/v%)		Yield (%)	Productivity (g/l/h)
Batch	42	2.97	5.12	4.08	93.7	0.9
Continous	50	4.53	4.36	3.47	79.8	3.4
	60	4.07	4.71	3.75	86.2	3.7
	66	4.78	4.16	3.31	76.1	3.3
	72	5.36	3.81	3.03	69.7	3.0
	78	4.71	4.08	3.24	74.5	3.2
	84	5.01	3.96	3.15	72.4	3.1

\*Fermentation condition : 30°C, pH 5.0, D=0.1h<sup>-1</sup>  
 \*Continous culture after 42 hrs of fermentation  
 \*Extract : °P (Plato)

**Table 2. Continuous alc. ferment. without cell recycle at 15°P media.**

Process	Time (hr)	Extract (°P)	Ethanol (v/v%, w/v%)	Yield (%)	Productivity (g/l/h)
Batch	48	3.92	6.81 5.44	92.2	1.1
Continuous	60	6.36	5.82 4.64	78.6	4.6
	72	9.34	4.17 3.31	56.1	3.3
	84	8.40	4.46 3.55	60.1	3.5
	96	7.50	5.40 4.3	72.9	4.3
	108	7.96	4.60 3.66	62.0	3.6
	120	7.10	5.22 4.16	70.5	4.1
	132	6.53	5.54 4.41	74.7	4.4

\*Fermentation condition: 30°C, pH 5.0, D=0.1h<sup>-1</sup>

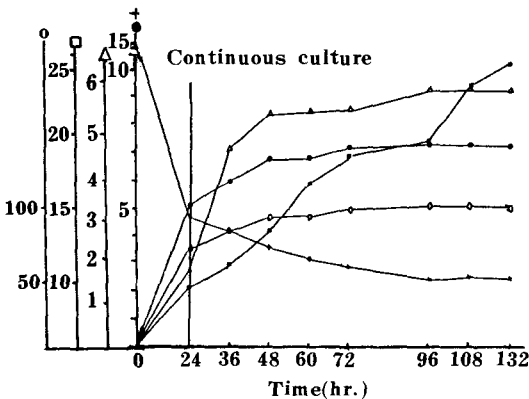
\*Continuous culture after 48 hrs of fermentation

\*Extract : °P (Plato)

**HFR연속발효 실험결과 및 고찰**

본 실험은 연속발효에서의 단점, 즉 최종 알콜농도의 감소, 발효율 및 생산성의 저하 현상을 개선하여 발효조내의 알콜농도를 높여, 생산성을 증가시킬 목적으로 HFR을 이용하여 발효조내에 균체순환을 시켜주면서 연속발효를 실시한 결과는 Fig. 4, 5 및 6 과 같다.

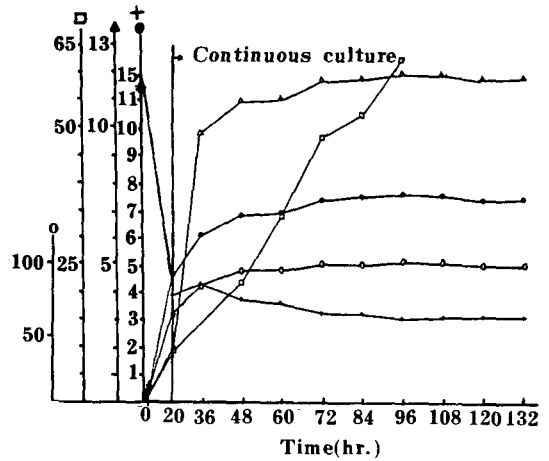
Fig. 4 에서와 같이 희석율이 0.1h<sup>-1</sup>일때 연속발효 24시간만에 발효율이 95%를 넘었으며 48시간 이후에는 당소비가 완전히 이루어진 것으로 나타났다. 이때의 알콜농도는 7.64% (v/v) 이었으며 생산성은 6.1g/l/h 이었다. 여기서 발효율이



**Fig. 4. Continuous alcohol ferment. by cell recycling with HFR at D=0.1 h<sup>-1</sup>**

Ferment. condition : Temp. 30°C, pH 5.0.

- Alcohol content (v/v %),
- △ Productivity (g/l/h),
- Cell mass (g/l), 0 Yield (%) ,
- + Extract = Sugar degree (°P)



**Fig. 5. Continuous alcohol ferment. by cell recycling with HFR at D= 0.2 h<sup>-1</sup>**

Ferment. condition: Temp. 30°C, pH 5.0

- Alcohol content (v/v %), △ Productivity (g/l/h)
- Cell mass (g/l), 0 Yield (%)
- + Extract = Sugar degree (°P)

100%가 약간 넘게 나타난 것은 천연 맥즙배지중에 70%의 Maltose와 14.1%의 Maltotriose 등<sup>(15)</sup> 이 함유되어 있어 이를 이용한 것으로 생각된다.

한편 Fig. 5 및 6 에서와 같이 Dilution rate가 0.2 h<sup>-1</sup> 일때 알콜농도는 7.62% (v/v)로 가장 높아 발효율이 102.7%로 나타났으며 균체량도 Dilution rate가 증가함에 따라 증가하여 D가 0.1h<sup>-1</sup>일때 발효조내 최고 균체농도는 26g/l 이었으나 0.2h<sup>-1</sup>일 때는 65.8g/l로 나타났다. Dilution rate가 0.3h<sup>-1</sup> 일때 이 실험에서의 최종 알콜농도는 7.54% (v/v) 이었으며 이때의 productivity 및 발효율은 각각 18.1g/l/h와 102% 이었다. 발효성 당은 발효시간의 흐름에 따라 감소하여 거의 0에 이르렀으며 맥즙배지중에 비발효성당만 남게되어 발효조내의 알콜농도는 일정한 수준으로 계속 유지되었다.

Cell mass를 spectrophotometer로 측정하여 계산한 결과 Dilution rate가 0.2h<sup>-1</sup> 및 0.3h<sup>-1</sup>일때 96시간 배양후 각각 65.8g/l와 68.7g/l로 나타났다. 그러나 특히 D=0.3h<sup>-1</sup>일때 발효시간의 흐름에 따라 HFR의 membrane이 막히는 현상이 나타나 발효조의 media level보다 높아져 발효조내의 Cell을 제거해 주었기 때문에 실체는 이보다 높은 것으로 생각된다.

한편 HFR 연속발효 시작후 실험수행 기간(6일)에는 Yeast viability가 83.9% 이었다.

Chang 등<sup>(16)</sup>은 발효후 실험기간내(50시간)에 Viability가 98% 이었다고 보고한 바 있다.

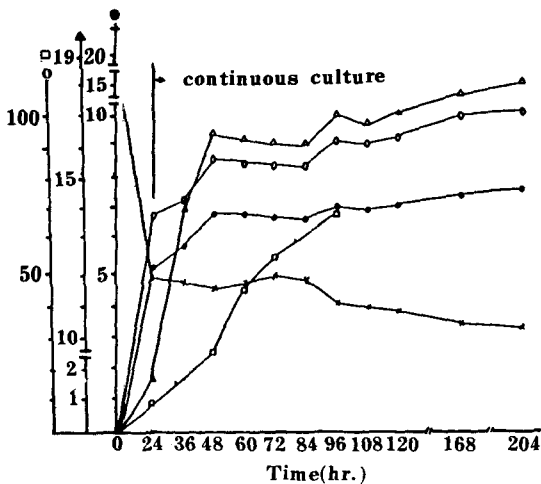


Fig. 6. Continuous alc. ferment. by cell recycling with HFR at  $D=0.3\text{ h}^{-1}$

● Alcohol content (v/v %), △ Productivity (g/l/h)  
 □ Cell mass (g/l), 0 Yield (%)  
 + Extract = Sugar degree (°P)

Janssens 등<sup>(17)</sup>은 lactose를 당으로 사용하여 Cell Recycle을 시킨 알콜연속 발효실험에서 알콜농도가  $D=0.05\text{ h}^{-1}$ 일때 58 g/l로 가장 높았으며 productivity는  $D=0.15\text{ h}^{-1}$ 일때 7.1 g/l/h로 가장 높았다고 보고하였다. 또한 Linko 등<sup>(18)</sup>은 *Sacch. cerevisiae*를 고정화한 연속발효 실험에서 알콜농도가 70 g/l이었으며 productivity는 15.6 g/l/h라고 보고한 바 있다. Cell Recycle 연속배양에 관한 연구로는 Cysewski 등<sup>(2)</sup>이 실험한 결과에 의하면  $D=0.63\text{ h}^{-1}$ 에서 알콜농도가 46 g/l이었으며 productivity는 29 g/l/h이었다. 이는 본 실험에서 보다 높은 결과였다.

한편 Cheung 등<sup>(19)</sup>은 Immobilized whole cell reactor를 사용한 실험에서  $D=0.46\sim 0.48\text{ h}^{-1}$ 일때 productivity가 가장 높아 14.2 g/l/h이었다고 보고하였다. 그러나 산업적 응용면에서 진공발효(Vacuum fermentation)는 fermenter의 특수한 설계와 열에너지의 높은 소비성 때문에 가까운 장래에 실용성이 없는 것으로 보인다<sup>(20)</sup>. 또한 Immobilized cell reactor 보다는 본 reactor가 Cell을 고정화 시키지 않고 좋은 효과를 얻을 수 있는 장점이 있다. 특히 HFR의 크기를 조절하여 사용할 때 생산성이나 알콜농도등 좋은 결과를 얻을 수 있다고 생각된다. 한 예로서 Munir Cheryan 등<sup>(21)</sup>에 의하면  $D=2.0\text{ h}^{-1}$ 에서 알콜농도가 65 g/l이었으며 130 g/l/h까지의 높은 productivity를 얻었다고 보고한 바 있다.

연속발효와 HFR연속발효의 비교

이상의 연구에서 Batch식, 연속발효 및 HFR 연

Table 3. Comparison of characteristics in Batch & Continuous culture with or without HFR cell recycle.

Process	Ethanol (v/v %)	(w/v %)	Yield (%)	Productivity (g/l/h)	Remark
Batch	6.81	(5.44)	92.2	1.1	-
Continuous	5.82	(4.64)	78.6	4.64	$D=0.1\text{ h}^{-1}$
HFR Continuous	7.54	(6.02)	102	18.06	$D=0.3\text{ h}^{-1}$

속발효의 주요결과를 요약하면 Table 3과 같다.

Table 3에서와 같이 최종알콜 농도는 HFR 연속 발효 공정에서 7.54% (v/v)로 가장 높았으며 연속 발효 공정에서 가장 낮아 5.82% (v/v)이었다. 생산성에 있어서는 연속발효의 경우 Batch식 발효에 비해 4.1배 높게 나타났으며, HFR 연속 발효의 경우는 연속발효의 4배, Batch식 발효에 비해 16.3배나 크게 증가하였다. 또한 본 실험에서 발효율을 생각할때 연속배양의 경우 78%이었으나, HFR 연속발효에서는 100% conversion된 것으로 나타났다. 이러한 사실은 Dilution rate를 올려 높은 알콜농도와 productivity를 얻을 수 있다는 것을 제시해 준다. 그러나 본 실험에서 HFR의 용량의 한계 때문에 Dilution rate를  $0.3\text{ h}^{-1}$ 까지만 실시하였으나 용량이 큰 HFR을 이용할 때 Dilution rate를 더 올려 원하는 알콜농도와 생산성이 될때까지 조절할 수 있으리라 생각된다. 한편 Nagashima 등<sup>(6)</sup>은 Immobilized yeast cell reactor를 사용한 실험에서 알콜 생산성을 Batch식 발효에 비해 20배나 높일 수 있었다고 보고한 바 있다.

요 약

*Sacch. cerevisiae var. ellipsoideus* 균주를 이용 산업용 천연맥즙배지를 사용한 알콜연속 발효시 Hollow Fiber Recycle Reactor를 이용 Cell Recycle을 시켜 발효조내의 알콜 생산성을 높이기 위해 본 실험을 실시하였으며, 특히 Batch식과 연속발효시 HFR 유무에 따른 특성을 비교검토한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. Dilution rate가  $0.1\text{ h}^{-1}$ 일때 11°P 및 15°P media를 이용한 알콜 연속발효에서 알콜농도는 4.71% 및 5.82% (v/v)이었으며 이때의 발효율은 각각 86.2%와 78.6%이었다.

2. HFR 연속발효에서  $D=0.1\text{ h}^{-1}$ 일때 알콜농도는 7.64% (v/v)로 높았으며, 이때의 생산성은 6.1 g/l/h이었다. 또한  $D=0.2\text{ h}^{-1}$ 일때 알콜농도와 생산성은 각각 7.62% (v/v) 및 12.2 g/l/h이었다.

3. HFR 연속발효에서  $D=0.3h^{-1}$  일때 알콜농도가 7.54% (v/v) 이었으며 알콜생산성은 18.1g/l/h 이었다.

4. 알콜 생산성 비교에서 HFR 연속발효는 연속 발효에 비해 4 배의 증가효과가 있었으며 Batch 발효에 비해서는 16.3 배나 크게 증가하였다.

### 참고문헌

- Paulo Affonso Doin, Jose Eduardo Olivo, Vera Lucia Varella, Bruno Roberto Concone and Armenio Gomes Pinto: *J. Ferment. Technol.* Vol. 62, No. 2, 195 (1984).
- Gerald R. Cysewski and Charles R. Wilke: *Biotech. Bioeng.* Vol. XIX, 1125 (1977).
- Savitree Limtong, Masanori Nakata, Hitoshi Funahashi, toshiomi Yoshida, Tatsuji Seki, Jaron Kumnuanta and Hisaharu Taguchi: *J. Ferment. Technol.* Vol. 62, No. 1, 55 (1984).
- Mitsuru Wada, Jyoji Kato and Ichiro Chibata: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 275 (1980).
- O. Moebus and M. Teuber: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 94 (1982).
- Minoru Nagashima, Masaki Azuma, Sadao Noguchi, Keiichi Inuzuka: *Biotechnol. Bioeng.* Vol. XXVI, 992 (1984).
- Shinji Goto, Takeshi Kuwajima, Rokuro Okamoto and Taiji Inui: *J. Ferment. Technol.* Vol. 57, No.1, 47 (1979).
- J.K. Kan and L. Shuler: *Biotechnol. Bioeng.* Vol. XX, 217 (1978).
- Roger A. Korus and Alfred C. Olson: *Biotechnol. Bioeng.* Vol. XIX, 1 (1977).
- Yoshinori Nishizawa, Yutaka Mitani, Kunio Fukunishi and Shiro Nagai: *J. Ferment. Technol.* Vol. 62, No. 1, 41 (1984).
- P.L. Rogers, K.J. Lee and D.E. Tribe: *Pro. Biochem.* Vol. 5, No. 7 (1980).
- Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists (1976).
- P. Cleary: *J. of Institute Brew.* Vol. 91 (1985).
- T. Ghose: *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 21, (1979).
- J.R.A. Pollock: *Brewing Science* Vol. 2 184 (1981).
- Ho Nam Chang, Chang Woo Lee and Bong Hyunn Chung: The 1st International Biotechnol. Symposium. 103 (1985).
- J.H. Janssen, A. Bernard, R.B. Bailey: *Biotechnol. Bioeng.* Vol. XXVI, 1 (1984).
- Y. Linko: *Biotech. Letters*, 3 (1981).
- I.H.S. Cheung, P. Ghosh, N.B. Pamment: 6th Australian Biotechnol. Conference 62 (1984).
- H. Dellweg: *Biotechnology.* Vol. 3 272 (1983).
- Munir Cheryan and Mohamed A. Mehaia: *Pro. Biochem.* Vol. 19 No. 6, 204 (1984).