

고정화효모를 사용한 시트르산 생성에 있어서의 CaCl₂ 함유배지에 의한 활성화 효과

임동준 · 최차용*

영남대학교 공과대학 공업화학과

*서울대학교 공과대학 공업화학과

(1986년 6월 16일 수리)

Citric Acid Production Using Immobilized Yeast Activated with CaCl₂ - containing Medium

Dong Joon Lim and Cha Yong Choi*

Department of Industrial Chemistry

College of Engineering, Yeungnam University, Kyongsan 643, Korea

*Department of Chemical Technology

College of Engineering, Seoul National University, Seoul 151, Korea

(Received June 16, 1986)

Immobilized *Candida lipolytica* cells were prepared by entrapping the whole cells in calcium alginate gel. To enhance citric acid productivity, immobilized cells were incubated with activation medium in fluidized-bed reactors. When the activation was done in batch operation, maximum citric acid productivity appeared in a much shorter time than in continuous operation. Activated immobilized cells were enhanced about 10-fold in citric acid production relative to non-activated immobilized cells. The productivity of citric acid was also influenced by bead size. When immobilized cells were reacted in a fluidized-bed reactor with the same quantity of cells, the citric acid productivity was increased as the bead size was decreased.

시트르산은 자연성분이며 식물과 동물의 대사물질로서 식품과 약품분야에 널리 이용되는 유기산의 한가지이다. 시트르산은 1920년대 말까지만 하더라도 과일에서 분리하여 생산하였으나, 오늘날에는 대부분 미생물 발효에 의해 생산되고 있다. 1893년 Wehmer가 설탕과 탄산칼슘의 용액에서 곰팡이에 의해 시트르산이 생성되어짐을 본 이래 1952년에는 액체 배양 공정⁽¹⁾으로 상업화될 수 있었다. 곰팡이에 의한 시트르산 생성에 관해서는 오래전부터 최근까지 많은 연구⁽²⁻¹²⁾가 계속되어져 왔다. 효모에 의한 시트르산 생성에 관한 연구는 1968년 Tabuchi 등⁽¹³⁾에 의해 처음으로 발표된 이래 지금까지 다수의 연구⁽¹⁴⁻²⁵⁾가 보고되고 있다. 효모는 곰팡이의 경우와는 달리 이소시트르산을 부생시키나, 기질로

는 탄수화물 이외에도 글리세롤, 천연유, 지방산, 초산, 낙산, 대두유, 어유, 야자유, n-paraffin 등을 사용할 수 있다. 이소시트르산의 생성은 변이주를 만들어서 억제시킬 수 있었는데, Akiyama 등⁽¹⁹⁾은 monofluoroacetate를 사용하였으며 Ikeno 등⁽²¹⁾은 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine을 사용하였다.

한편 근래에는 많은 종류의 미생물들이 고정화되어 반응이 수행되고 있는데 그것은 세포를 고정화함으로써 고정화되지 않은 세포에 비해 많은 장점을 가질 수 있기 때문이다. 미생물 세포의 물리적 결합에 근거를 둔 entrapment에 의한 고정화는 polyacrylamide⁽²⁶⁻²⁸⁾, carrageenan^(29, 30), alginate^(31, 32) 등을 주로 사용하고 있다. Polyacrylamide gel에 의한 방법은, acrylamide 단량체의 독성, 자유 라디칼

Key words: citric acid, activation, bead size, yeast, immobilization, fluidized-bed reactor

에 의한 증합시 열의 발생등으로 세포의 활성을 저해하며 또한 담체에 세포를 많이 포괄시킬 수 없고 내마모성이 크며 불규칙한 형태를 가지는 단점이 있다.

Carrageenan gel에 의한 방법은 기계적 안정성이 크고 세포에 독성을 끼치지 않으며, polyacrylamide gel에 의한 방법보다 고정화 세포의 활성이 크며, 여러 형태의 고정화 세포를 만들 수 있는 등 장점은 많으나, 세포 고정화 공정중 비교적 높은 온도가 요구되므로 저온에서 증식하는 세포에는 이용되기 어려운 단점이 있다. Alginate gel에 의한 방법은 고정화 공정이 간단하고 값이 싸며, 세포에 독성을 끼치지 않고 담체에 많은 세포를 포괄시킬 수 있으며, 내압축성 내마모성이 크고 또한 고정화 세포에 기질의 접근을 쉽게하는 등 여러가지 장점을 지니고 있다.

본 연구에서는 효모인 *Candida lipolytica* MX 9-11 R3 세포를 calcium alginate gel로 포괄 고정화시킨 것을 세포 증식 배지에서 회분식 유동층 반응기와 연속식 유동층 반응기 방식으로 활성화시켜 보았으며, 활성화 시간과 활성화 반응기 방식에 따라서 고정화 세포의 활성에 어떤 영향을 미치는지 조사하여 보았다. 또한 고정화 bead의 크기가 시트르산 생성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해서, 고정화 bead의 크기를 달리하여 회분식 유동층 반응기 방식으로 실험하여 보았다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 일본 오사카대학 발효공학과의 Aiba 교수로부터 분양받은 *Candida lipolytica* MX-9-11 R3를 사용하였으며, 이것을 Table 1에 나타낸 사면배지에 접종하여 28°C에서 24시간 배양한 후 4°C에서 보관하였고, 1개월마다 계대 배양시켜 보관하였다. 균체 증식에 사용한 배양액의 조성은 Table 2에 나타내었다.

미생물 배양

500ml 용 삼각플라스크에 Table 2에 표시된 조성의 배지를 포도당과 그 외의 성분으로 분리하여 각각 120°C에서 20분간 멸균시킨 후 28°C 이하로

Table 1. Medium composition for slant culture

Component	Concentration (W/V %)
Yeast Extract	1
Peptone	2
Glucose	2
Agar	2

Table 2. Medium composition for shake culture (g/l)

Component	Concentration (g/l)
Glucose	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
Yeast Extract	1
KH ₂ PO ₄	5 × 10 ⁻¹
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5 × 10 ⁻¹
NaCl	1 × 10 ⁻¹
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2 × 10 ⁻³
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2 × 10 ⁻³
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 × 10 ⁻³
Thiamine-HCl	5 × 10 ⁻⁵
CuSO ₄ · 5H ₂ O	5 × 10 ⁻⁵

충분히 냉각되었을 때 서로 합하여 100ml 되게 하였다. 여기에 *Candida lipolytica*를 접종하여 28°C에서 36시간 진탕 배양시켜서 세포 고정화에 사용하였다.

세포 고정화 과정

배양된 세포를 3000 rpm에서 5분간씩 원심분리하여 모은 세포를 증류수로 세척하고 다시 원심분리하는 과정을 3회에 걸쳐 반복한 후 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 증류수로 희석한 후 sodium alginate 용액과 충분히 섞어서 주사기에 넣고 압출하여서 0.1M CaCl₂ 용액에 적하하여 calcium alginate로 세포가 고정화된 bead를 만들 수 있었다. 이

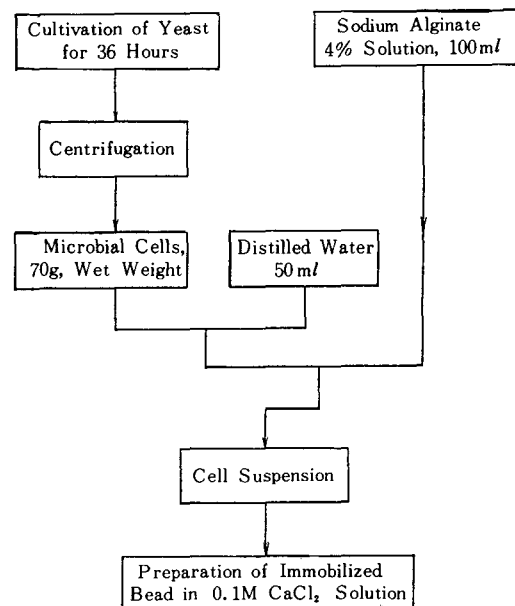


Fig. 1. The procedure for immobilization.

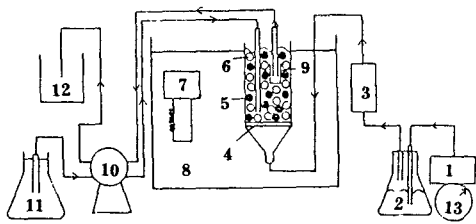


Fig. 2. A Dia gram showing the continuous fluidized-bed reactor system.

1. Air generator
2. Air filtration chamber
3. Air flow meter
4. Support (sintered glass filter)
5. Beads with immobilized cells.
6. Air bubbles
7. Thermostat and circulator
8. Water bath
9. Glass screen
10. Micro tubing pump
11. Substrate reservoir
12. Product reservoir
13. Voltage regulator

용액을 4℃로 하여 2시간 숙성시킨 후, 고정화 bead를 증류수로 세척하여 0.025M CaCl₂ 용액에 넣고 4℃에서 보관하여 사용하였다. 세포 고정화 과정을 Fig. 1에 나타내었다.

실험 장치

본 실험에 사용된 유동층 반응기는 밀부분을 유리필터로 구성하여 내경 4.2cm×높이 2.5cm의 원통형 유리 컬럼을 만들어서 반응기의 밀부분에서부터 반응기 내부로 공기를 불어 넣을 수 있도록 하였다. 반응기 내로 넣어 주는 공기의 공급은 기포 발생기(Cheongtap Electric Co.)를 사용하였으며, 공기 유량 속도의 조절은 슬라이드스를 사용하였다. 연속식 유동층 반응기 방식으로 반응을 수행할 때는 마이크로 튜빙 펌프(Tokyo Rikakikai Co. Model MP)를 사용하여 기질 용액을 공급하고, 반응된 용액을 유출시켰다. Fig. 2는 연속식 유동층 반응기 방식으로 반응을 수행하는 실험 장치의 구성을 나타낸 것이다.

활성화 용액

Table 2에 표시된 조성의 배지에 CaCl₂가 1.1g/l되게 함유한 용액을 활성화 용액으로 하였다.

표준 기질 용액

4%(W/V)의 포도당 용액에 고정화 bead의 안정제인 CaCl₂가 10mM 농도가 되게 포함된 용액을 표준 기질 용액으로 사용하였다.

반응 온도 및 공기 유량 속도

본 실험에 이용된 반응계의 온도는 28℃로 하였

으며, 유동층 반응기에 공급되는 공기 유량 속도는 1.2l/min로 하였다.

고정화 bead내의 세포수 측정

0.2M Sørensen's citrate완충용액 (pH 5.7) 20ml에 고정화 bead 10개를 넣어서 ice bath위에서 2시간 동안 저어서 완전히 녹인 후 hemacytometer로 세포수를 측정하였다.

분석법

시트르산 분석은 Marier와 Boulet 방법⁽³³⁾으로 수행하였으며, 포도당 분석은 Somogyi 변법⁽³⁴⁾으로 수행하였다.

결과 및 고찰

회분식 유동층 반응기 방식에 의한 고정화 bead의 활성화

고정화 *Candida lipolytica*세포의 시트르산 생성 활성을 높이기 위해서 회분식 유동층 반응기에 지름이 2.4mm인 고정화 bead를 각각 910개씩 넣고 활성화 용액을 100ml씩 넣어서 활성화 시간을 각각 4시간 30분, 9시간, 13시간 30분, 18시간, 22시간 30분, 27시간으로 하여 28℃에서 공기 유량 속도를 1.2l/min로 하여 회분식으로 반응시켰다. 이 활성화 반응이 끝난 용액내의 포도당과 시트르산의 농도를 측정하였으며 활성화된 bead내의 세포수

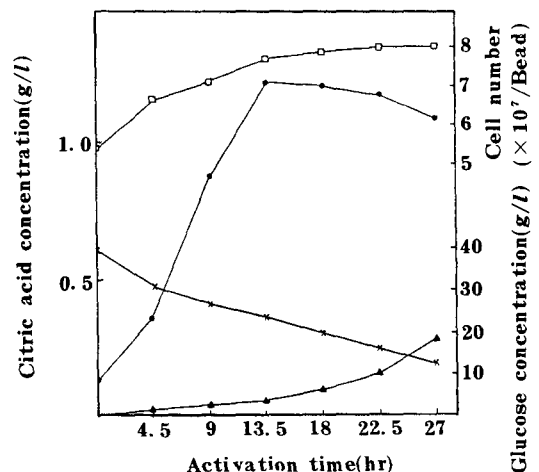


Fig. 3. Time course behaviour of immobilized yeast activation.

□ : Cell number per bead after activation
 × : Glucose concentration during activation
 ● : Citric acid concentration during activation
 ▲ : Citric acid production after 24 hours of reaction with activated beads
 Activation was carried out in activation medium

를 측정하였다. 이번에는 이 활성화된 bead를 즉시 활성화 용액에서 꺼내어 증류수로 깨끗이 씻은 직후 회분식 유동층 반응기에 900개 썩 넣고 표준 기질 용액을 100ml씩 넣어서 회분식으로 24시간 반응시켰으며 이 때 생성된 시트르산의 농도를 측정하였다. 이 실험 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 여기서 활성화 기간이 13시간 30분이 될 때까지는 시트르산 생산성이 급격히 늘어나는 것을 볼 수 있는 바, 이는 같은 기간중 bead한개당 세포수의 증가에 일부 기인한다는 것을 같은 그림의 bead당 세포수의 plot으로부터 알 수 있으나 한편 bead내의 세포에 필요한 효소 및 보조효소의 증가에 의하여 세포 한개당 활성의 증가에 기인한 것으로 사료되어진다. 그러나 활성화 기간이 13시간 30분을 넘어 길어지면 전반적인 시트르산 생산성이 떨어짐을 역시 같은 그림으로부터 볼 수 있는데, 이는 bead내의 세포수는 조금씩 증가는 하나 세포 한개당 활성이 세포의 역가 저하에 의하여 줄어들거나 활성화 배지의 조성변화가 세포 활성화에 또한 바람직하지 못한 영향을 준 결과로 생각되어진다. 한편 13시간 30분 동안 활성화시킨 bead를 사용하여 회분식 유동층 반응기에서 24시간 반응을 수행 하였을 때가 활성화시키지 않은 bead를 사용하여 반응을 수행했을 때 보다 약 10배 정도 시트르산 생산성이 증가하였다.

연속식 유동층 반응기 방식에 의한 고정화 bead의 활성화

유동층 반응기에 지름이 2.4mm인 고정화 bead를 3,760개 넣고 멸균된 활성화 용액을 200ml 넣은 후 유동층 반응기내로 활성화 용액을 연속적으로 공급함과 동시에 반응기 외부로 반응된 용액을 연속적으로 뽑아내는 연속식 유동층 반응기 방식으로 고정화 bead를 활성화시켰다. 이때 반응기내로 공급되는 공기의 유량속도는 1.2l/min되게 하였다. 반응 초기에는 유동층 반응기 내로 들어가는 활성화 용액의 공급속도와 반응기 밖으로 나오는 반응용액의 유출속도가 120ml/hr되게 유지하여 12시간 동안 활성화시킨 후 반응기 밖으로 활성화된 bead를 470개 꺼내어 내고 반응기 내의 용액 200ml 중 25ml를 채취하였다. 그다음 활성화 용액의 희석속도가 반응초기와 동일하게 0.6hr⁻¹으로 유지되도록 활성화 용액의 공급속도와 반응된 용액의 유출속도를 105ml/hr로 변경하여서 계속하여 12시간 동안 활성화 시켰다. 이때 반응기내로 공급되는 공기의 유량 속도는 계속 1.2l/min가 유지되도록 슬라이드로 다시 조절하였다. 이렇게 하여 계속 12시간 반응시킨 후 재차 활성화된 bead를 470개 꺼내어

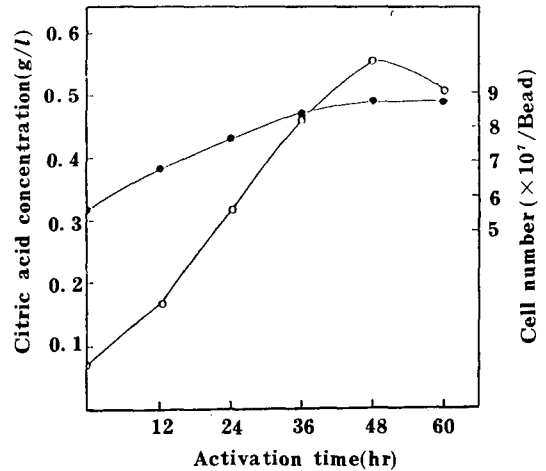


Fig. 4. Time course behaviour of continuous activation of immobilized yeast in the activation medium using the continuous fluidized-bed reactor.

Dilution rate=0.6hr⁻¹

○; Citric acid production after 24 hours of reaction with activated beads.

●; Cell number per bead after activation.

내고 반응기 내의 용액 175ml 중 25ml를 채취한 후, 다시 반응기내의 희석속도가 0.6hr⁻¹으로 유지되도록 활성화 용액의 공급속도와 반응된 용액의 유출속도를 90ml/hr로 변경하고 공기 유량속도가 계속 1.2l/min를 유지하도록 조절하여 12시간 동안 계속하여 활성화를 수행한 후 활성화된 bead를 다시 470개 꺼내어 내고 반응기내의 용액 150ml 중 25ml를 채취하였다. 이때 12시간 마다 25ml의 용액을 반응기에서 꺼내어 낸 것은 반응기내의 액체의 부피당 bead의 수를 일정하게 하기 위해서였다. 이런 방식으로 60시간 까지 계속 활성화시켜서 활성화시간이 각각 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간씩 경과된 활성화된 고정화 bead를 얻었다.

활성화된 bead내의 세포수는 hemacytometer를 사용하여 활성화 시간이 각각 다른 bead당 세포수를 구하였다. 이렇게 하여 활성화된 bead들을 채취한 즉시 각각 유동층 회분 반응기에 450개씩 넣고 표준 기질 용액을 100ml씩 채운 후 24시간 동안 회분식으로 반응을 수행시켰으며 이때 생성된 시트르산의 농도를 측정하였다. 이 실험결과를 Fig. 4에 나타내었다. 여기서 활성화 시간이 48시간 될때까지는 시트르산 생산성이 점차 증가되다가 그 이상의 시간에서는 시트르산 생산성이 감소 되었음을 볼 수 있다. 이는 bead한개당 수용할 수 있는 최대의 세포수까지 세포증식이 일어난 후 세포 한개

당 활성이 세포의 역가 저하에 의하여 줄어들거나 활성화 배지의 조성 변화가 세포 활성에 바람직하지 못한 영향을 준 결과로 생각되어지며 또한 세포 증식으로 인하여 bead내의 자유 공간이 줄어들어 반경 방향으로의 물질전달에 필요한 유효단면적의 감소에 기인한다고 사료된다. 활성화 bead내의 세포수는 활성화 시간이 48시간 될 때 까지는 증가하였으나 그 이상의 시간에서는 더 증가하지 않았다. 이는 활성화 시간이 경과함에 따라 세포가 증식되어 bead내의 세포수가 계속 증가하여서 bead 한개당 수용할 수 있는 최대의 세포수에 이르면 그 이상 새로 증식되는 세포는 bead밖으로 빠져 나가는 데 기인한 것으로 사료되어진다. 활성화 용액의 희석속도를 0.6hr^{-1} 으로 하여 연속식으로 48시간 활성화시킨 bead를 사용하였을 때가 전혀 활성화시키지 않은 bead를 사용하였을 때 보다 약 9배 정도의 시트르산 생산성의 증가를 보였다.

한편 Fig. 3의 회분식 유동층 반응기 방식으로 활성화시켰을 때에는 활성화 시간을 13시간 30분으로 한 bead를 사용하였을 때 최대의 시트르산 생성 활성을 보였으나, 연속식 유동층 반응기 방식으로 활성화시켰을 때에는 활성화 시간을 48시간으로 한 bead를 사용하였을 때 최대의 시트르산 생성 활성을 보였다. 이와 같은 최대 시트르산 생성 활성화 시간의 차이는 연속식으로 활성화시킬 때는 bead

가 계속 새로운 환경에 놓이게 됨으로 인하여 bead내의 세포에 필요한 효소 및 보조효소가 bead 밖으로 계속 유출됨으로 인하여 bead내의 효소 및 보조효소의 축적에 많은 시간이 걸리므로 회분식보다 낮은 시간에 최대의 활성을 나타낸 것으로 사료되어지며, 이것은 bead가 새로운 환경에 적응하는데 걸리는 시간 즉 lag time으로도 설명되어질 수 있다.

고정화 bead의 크기에 따른 시트르산 생산성의 변화

시트르산 생산에 있어 고정화 bead의 크기의 영향을 보기 위해서 삼각플라스크에서 36시간 배양하여 원심분리한 세포를 wet weight로 각각 3g씩 취하여 Fig. 1에 도시한 방법으로 고정화 bead의 지름의 크기가 각각 2.2, 2.5, 2.8, 3.1mm인 bead를 1520, 1040, 740, 540개씩 만들었다. 이렇게 만든 크기가 다른 고정화 bead와 고정화하지 않은 세포 3g(wet weight)을 회분식 유동층 반응기에 각각 넣고 표준 기질 용액을 100ml씩 넣은 후 반응을 수행하였다. 이때 반응기내의 용액과 bead와의 구성 비율을 처음 상태와 동일하게 유지하면서 계속 반응을 수행할 수 있도록 시료를 5 ml씩 채취함과 동시에 고정화 bead를 각각 76, 52, 37, 27개씩 끄집어 낸 다음 반응을 계속 수행하였다. 이 실험 결과를 Fig. 5에 나타내었는데, 여기서 bead의 크기가 작을수록 시트르산의 생성량이 많았으며, 또한 세포를 고정화하지 않고 반응을 수행하였을 때가 세포를 고정화하여 반응을 수행하였을 때보다 시트르산이 더 많이 생성되었음을 볼 수 있다. 이것은 유동층 회분 반응기에 들어간 세포수는 각각의 경우 똑같으나 bead의 크기가 작을수록 부피에 비하여 높은 표면적을 가지므로 세포의 많은 수가 반응에 참여하게 되며, 또한 bead의 크기가 작을수록 bead내로의 확산저항이 작아서 bead내부의 물질전달이 잘되어 시트르산이 많이 생성되어진 것으로 사료된다. 이 실험 결과를 bead의 크기에 대하여 effectiveness factor로 plot 한 것을 Fig. 6에 나타내었다. Michaelis-Menten형의 반응속도식을 갖는 경우에 대한 effectiveness factor에 대한 표시식은 완전히 analytic한 식은 유도되어 있지 않으나 개략적인 식은 유도된 바 있다. 그러나 1차반응과 0차반응에 대해서는 완전한 표시식이 유도된 바 있으며 Michaelis-Menten형의 반응 속도식인 경우 기질 농도가 낮을 때는 1차 반응으로 생각될 수 있으며 따라서 1차 반응에 대한 effectiveness factor η 의 표시식을 쓸 수 있을 것이며 구형을 갖는 bead에 대한 그 표시식은 다음과 같이 쓸 수 있다.

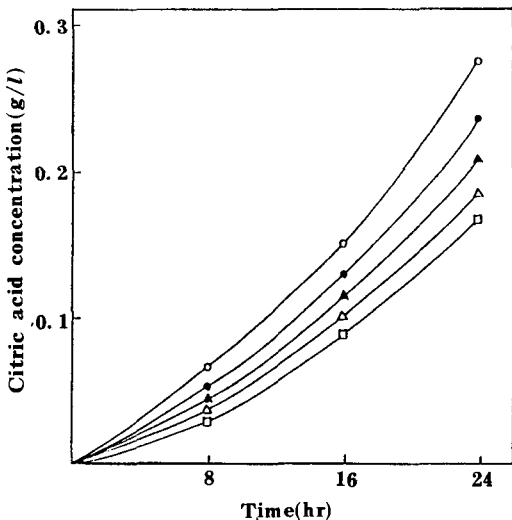


Fig. 5. Effect of immobilized bead size on citric acid production.

- : Homogeneous cell
- : Bead diameter; 2.2mm
- ▲ : Bead diameter; 2.5mm
- △ : Bead diameter; 2.8mm
- : Bead diameter; 3.1mm

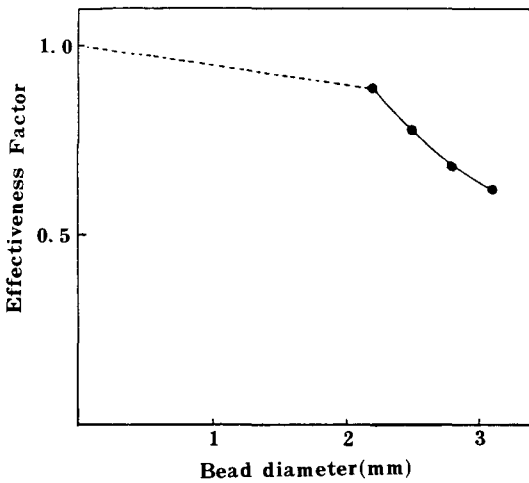


Fig. 6. Effect of immobilized bead size on effectiveness factor after 24 hours of reaction.

$$\eta = \frac{1}{\Phi_s} \left(\frac{1}{\tanh(3\Phi_s)} - \frac{1}{3\Phi_s} \right)$$

여기서

$$\Phi_s = \frac{r_s k_1 \rho_p}{3 D_e}$$

r_s : bead의 반경

D_e : 확산계수

k_1 : 1 차 반응의 속도정수

ρ_p : bead의 밀도

위 식에서 물질 전달 저항이 상대적으로 커질 경우에는 effectiveness factor는 다음식으로 간략화 될 수 있다.

$$\eta = \frac{1}{\Phi_s}$$

이 식에 의하면 bead내의 물질 전달 저항이 커질 경우에는 effectiveness factor가 반경에 역비례한다는 것을 알 수 있는 바 Fig. 6 은 이러한 사실을 최소한 정성적으로 따르고 있음을 보여주고 있다.

한편 세포를 고정화하지 않은 균일계로써, 연속식 운전방법으로 포도당 용액만을 기질로 하여, 반응을 수행할 때에는 반응기내에 세포증식에 필요한 다른 영양소가 없어서 세포를 계속 증식시킬 수 없어 세포가 반응기 밖으로 washout되므로 시트르산 생성 반응을 더이상 계속 수행할 수 없게 되며, 반면 Table 2 에 나타난 세포배양 용액으로 반응을 수행하면 포도당은 대부분 시트르산 생성보다는 세포를 증식시키는데 소비되어지므로, 연속식으로 반응을 수행할 때에는 고정화 bead의 크기를 작게 하

여 비균일계로써 반응을 수행하는 것이 단위 기질당 시트르산의 생성량을 증가시키게 할 것이다.

요 약

효모 *Candida lipolytica* 세포를 calcium alginate gel로 포괄 고정화시켜서, 유동층 반응기에서 반응을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고정화 효모 세포를 활성화 용액에서 회분식 유동층 반응기 방식과 연속식 유동층 반응기 방식으로 활성화시켰을 때, 세포는 고정화된 상태로 증식하였으며, 또한 세포당 시트르산 생성활성이 증가하여서, 활성화되지 않은 bead보다 최대 시트르산 생성 활성이 약 10배 정도 증가되었다.

2. 연속식 유동층 반응기 방식으로 활성화시킬 때가 회분식 유동층 반응기 방식으로 활성화시킬 때보다 낮은 시간에 최대의 시트르산 생성활성을 나타내었는데, 이것은 연속식으로 활성화시킬 때는 bead가 계속 새로운 환경에 놓이게 되어 bead내의 세포에 필요한 효소 및 보조효소가 bead 밖으로 계속 유출됨으로 인하여 bead내의 효소와 보조효소의 축적에 많은 시간이 걸린데 기인한 것으로 사료된다.

3. 회분식 유동층 반응기내에서 세포수를 동일하게 하여 반응을 수행할 때, 고정화 bead의 크기가 작을수록 시트르산의 생산성이 증가하였다. 이것은 bead의 크기가 작을수록 부피에 비해 높은 표면적을 가지므로 세포의 많은 수가 반응에 참여하게 되며 bead내로의 확산저항이 작아서 물질전달이 잘되어 시트르산이 많이 생성된 것으로 사료된다.

참고문헌

- Martin, S. M. and W. R. Waters: *Ind. Eng. Chem.* **44**, 2229 (1959).
- Currie, J. N.: *J. Biol. Chem.* **31**(1), 15 (1917).
- Amelung, H.: *Chem. Ztg.* **54**, 118 (1930).
- Karow, E. O. and S. A. Waksman: *Ind. Eng. Chem.* **39**, 821 (1947).
- Martin, S. M.: *Can. J. Microbiol.* **1**, 644 (1955).
- Noguchi, Y. and M. J. Johnson: *J. Bacteriol.* **82**, 538 (1961).
- Palacios, R. and C. Rolz: *Biotech. Bioeng.* **11**, 103 (1969).
- Wold, W. S. M. and I. Suzuki: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **50**(20), 237 (1973).
- Shadafza, D., T. Ogawa and A. Fazeli: *J. Ferment. Technol.* **54**(2), 67 (1976).

10. Kubicek, C. P. and M. Röhr: *Biochem. Biophys. Acta.* **615**, 449 (1980).
11. Singh, V. K., D. V. Vadehra and J. K. Gupta: *Enzyme Microbiol. Technol.* **3**, Oct., 341 (1981).
12. Bonatelli, J. R. and J. L. Azevedo: *Biotech. Lett.* **4**, 761 (1982).
13. Tabuchi, T., M. Tanaka and M. Abe: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **42**, 420 (1968).
14. Tabuchi, T., M. Tanaka and M. Abe: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **43**, 154 (1969).
15. Abe, M., T. Tabuchi and M. Tanaka: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **44**, 493 (1970).
16. Tanaka, M., Y. Tahara, T. Tabuchi and M. Abe: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **44**, 499 (1970).
17. Tabuchi, T., M. Tanaka, Y. Tahara and M. Abe: *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **44**, 562 (1970).
18. Nakanish, T., M. Yamamoto, K. Kimura and K. Tanaka: *J. Ferment. Technol.* **50**(12), 855 (1972).
19. Akiyama, S., T. Suzuki, Y. Sumino, Y. Nakao and H. Fukuda: *Agr. Biol. Chem.* **37**, 879 (1973).
20. Hattori, K., S. Yokoo and O. Imada: *J. Ferment. Technol.* **52**, 542 (1974).
21. Ikeno, Y., M. Masuda, K. Tanno, I. Oomori and N. Takahashi: *J. Ferment. Technol.* **53**, 752 (1975).
22. Aiba, S. and M. Matsuoka: *Eur. J. Microbiol. Biotech.* **5**, 247 (1978).
23. Aiba, S. and M. Matsuoka: *Biotech. Bioeng.* **21**, 1373 (1979).
24. Briffaud, J. and M. Engasser: *Biotech. Bioeng.* **21**, 2083 (1979).
25. Terasawa, M. and J. Takahashi: *Agr. Biol. Chem.* **45**, 2433 (1981).
26. Chibata, I., T. Tosa and T. Sato: *Appl. Microbiol.* **27**, 878 (1974).
27. Larsson, P. O., S. Ohlson and K. Mosbach: *Nature*, **263**, 796 (1976).
28. Ohlson, S., P.O. Larsson and K. Mosbach: *Biotech. Bioeng.* **20**, 1267 (1978).
29. Wada, M., J. Kato and I. Chibata: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **8**, 241 (1979).
30. Tanaka, I., K. Yamamoto, T. Tosa and I. Chibata: *Enzyme Microb. Technol.* **2**, 30 (1980).
31. Kierstan, M. and C. Bucke: *Biotech. Bioeng.* **19**, 387 (1977).
32. Cheetham, P. S. J., K. W. Blunt and C. Bucke: *Biotech. Bioeng.* **21**, 2155 (1979).
33. Marier, J. R. and M. Boulet: *J. Dairy Sci.* **41**, 1683 (1958).
34. Kobayashi, T. and T. Tabuchi: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **28**, 171 (1954).