

Cross-Flow Filtration 에 의한 항생물질 생산 균사체의 분리

정 상 철 · 윤 종 원 · 전 영 중 · 조 영 제 · 이 재 흥
제일제당 종합연구소

Separation of Antibiotics-Producing Mycelia by Cross-Flow Filtration

Sang-Cheol Jeong, Jong-Won Yun, Yeong-Joong Jeon,
Young-Je Cho and Jae-Heung Lee
R&D Center, Cheil Sugar & Co., Ltd., 522-1, Dokpyung-Ri,
Majang-Myon, Ichon-Kun, Kyonggi-Do, Korea

ABSTRACT

In separating mycelia from antibiotic fermentation broths, high permeate flux was obtained by cross-flow filtration using modified regenerated cellulose membrane. The flux was increased most effectively by increasing the flow rate. There existed a critical mycelium density (about 20% PMV) at which the highest flux was observed. In a batchwise concentration of the fermentation broth, the system suffered from a severe fouling problem, which was relieved drastically by applying diafiltration technique, although it increased the permeate volume. A combined concentration / diafiltration process was ideal in keeping relatively high flux together with a high product recovery yield. The best result was obtained by starting diafiltration after concentrating the broth to 20% PMV. By doing so, a 98% product recovery yield was achieved in the shortest time while keeping the permeate volume at a minimum level.

서 론

발효액으로부터 균체의 분리회수시 전통적으로 원심분리나 일반 여과 기술이 많이 사용되고 있으나 이들은 분리효율이 낮거나 연속작업이 어려우며 Aerosol, Filter Cake 등이 형성되는 단점이 있다(1,2). 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 근래에는 막 분리기술에 의한 균체 분리 회수방법이 활발히 연구되어 왔으나 이의 산업적인 적용은 막 주변의 Sublayer 형성 및 Fouling 현상으로 인한 급격한 Flux의 감소 문제로 인하여 많은 제약을 받아왔다(10). 그러나 최근 새로운 재질의 막 개발과 Cross-flow filtration 기술의 적용으로 Flux 감소문제를 상당히 해결하여 그 응용범위가 급속히 확장되고 있다(1-9). 막의 Fouling 현상은 여과압력, Feed액의 유속, 온도 등의 운전조건에 상당한 영향을 받으므로 이러한 운전조건의 조정으로 최소화시킬 수 있다(11). 효과적인 균체분리를 위하여 막분리에 적용시킬 수 있는 다른 방법은 Diafiltration이다(12). Diafiltration은 Permeation

되는 양만큼의 물을 Retentate에 공급하여 줌으로써 Fouling을 최소화시키는 동시에 발효산물의 회수율을 높여주는 방법이다. 그러나 이방법은 추가된 물에 의하여 Membrane 및 추후 정제공정에서의 Load가 늘어나는 단점을 가지고 있다.

본 연구에서는 항생물질 발효균사체로부터 Cross-flow Ultrafiltration에 의한 항생물질 회수시 막의 Fouling 현상에 대한 영향인자에 대하여 고찰하며 Diafiltration에 의한 여액의 Volume 증가와 작업시간을 최소화 할 수 있는 최적 Diafiltration point를 찾고자 하는데 그 목적을 두었다. 본 연구에서는 주로 *E.coli*를 대상으로한 기존의 유사한 연구와는 달리 Mycelium을 형성하는 균체를 대상으로한 점에 그 특징이 있다.

재료 및 방법

발효액

본 실험에 사용된 발효액은 *Micromonospora purpurea* 변이주를 32°C에서 6일간 배양한 배양액으로서 20~25%

의 Packed mycelium volume(PMV)의 최종 발효완료액을 Sulfuric acid로 전처리하여 (pH 3.0) Mycelia-bound 항생물질을 추출시킨 후 물을 첨가하여 최종 PMV를 약 10~15% 되게 조정하였다.

Membrane module

실험에 사용된 Module은 미국 Bio-Recovery사의 Pleated-type module (X-FLO Model)이며 막표면적은 0.046m²이었다. Membrane support plate 표면은 톱니형의 독특한 구조를 가지고 있어서 각 Channel에서 Turbulent flow를 유발시켜 막표면의 Sublayer 형성을 최소화시키게 설계되었다. 실험에 사용된 막은 MRC(modified regenerated cellulose), PSO(polysulfone), PSF(modified polysulfone) 세 종류로서 막의 Molecular cut-off value는 30,000(30 K)과 100,000(100 K)의 두가지를 사용했다.

장치 및 Membrane Cleaning

본 실험에 사용된 Cross-flow filtration system은 Fig. 1과 같다. Feed solution은 실험중에 계속 교반하였고 Constant temperature circulator를 열교환기에 연결시켜 Membrane module에 Feeding되기 전의 온도를 일정하게 유지시켰다. 실험중 PMV를 일정하게 유지시킬 필요가 있을 때에는 Permeate를 다시 Feed tank로 재순환시켰다. Diafiltration 실험시에는 Permeate flux와 동일 유속으로 Deionized water를 Feed tank에 공급하여 Feed solution의 농도를 일정하게 해 주었다. 각 실험후에는 Cleaning agent인 Ultrasil 53 (Henkel, West Germany)와 Deionized water를 사용하여 초기 Water flux로 회복될 때까지 Cleaning을 행하였다.

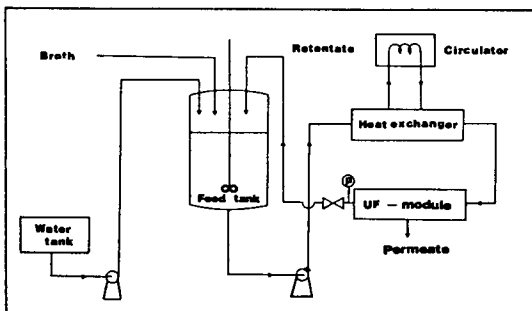


Fig. 1. A schematic diagram of the cross-flow ultrafiltration system.

분석방법

PMV는 발효액 10 ml를 5000 rpm에서 15분간 원심분리시켜 측정했으며 항생물질의 농도는 Lichrosorb RP 8 column을 사용한 HPLC(Waters Model 244)로 측정하였다. 또한 Permeate flux는 다음과 같은 식으로 계산되었다.

$$\text{Flux} = V/A \cdot t \tag{1}$$

여기서 V는 여과 부피이며 A는 사용된 막의 표면적, t는 여과부피의 특정시간이다.

결과 및 고찰

막의 선정

항생물질 발효균사체의 분리에 사용가능한 세가지 막에 대하여 Flux를 비교한 결과 Fig.2와 같이 MRC 30K의 경우에 4시간까지 평균 Flux가 40 l/hm² 이상으로 가장 높게 유지되었으므로 이후의 모든 실험은 이 막을 사용하여 실시하였다. 이 MRC 30 K 막은 Ultrafilter로서 균체분리시 통상적으로 사용되는 Microfilter보다 결코 Flux면에서 불리하지 않으며 또한 발효액 중에 함유되어 있는 고분자 Protein 등 불순물을 동시에 제거시켜 주는 역할을 함으로 추후의 정제공정을 용이하게 만드는 장점이 있다.

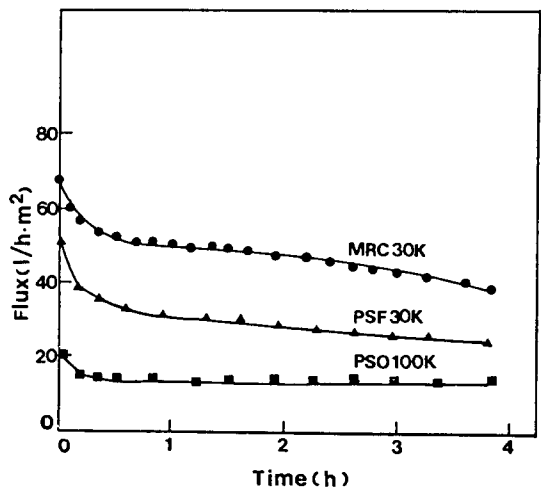


Fig. 2. Flux profiles of three different membranes.

PMV, 10%; Pressure 7 Psi; Temp, 20°C ; Flow rate, 3.6l/min.

Flux에 대한 영향인자

Transmembrane Pressure: Permeate Flux에 대한 Transmembrane pressure(TMP)의 영향을 알아보기 위해서는 PMV는 일정하게 유지시키면서 각 압력에서 5시간 후의 Flux를 측정하였다. 그 결과 Fig.3에서 보는 바와 같이 전형적인 Gel polarization limited behavior를 보여 주었다. 즉 낮은 TMP 영역에서는 압력증가에 따른 Flux 증가가 관측되었으나 그 이상의 영역에서는 Flux 증가가 없었다. 더우기 10% 이상의 높은 PMV에서는 7 Psi 이하의 낮은 TMP에서 이미 최대 Flux에 도달하여 그 이상의 압력증가에 따른 Flux 증가 효과는 거의 없었다.

Flow rate: Flow rate는 Cross-flow filtration에서 중요한 역할을 하는 변수로서 이미 보고된(10,11,13) 결과와 유사하게 본 실험에서도 Fig.4와 같이 Flow rate 증가에 의한 뚜렷한 Flux 증가효과를 볼 수 있었다. 그러나 Flow rate가 3.2 l/min에서 4.3 l/min로 약 1.35배 증가한데 대하여 Flux는 약 1.8배 증가하여 그 지수가 1.9로 와류 영역에서 통상적으로 관측되는 지수인 0.8-1.0(12)에 비하여 큰 것으로 나타났다.

Temperature: Fig.5에서 보는 바와 같이 온도 상승에 따라 Flux는 증가했으며 이와 같은 현상은 Cheryan 등(10)이 보고한 결과와 같이 온도상승에 따른 Viscosity의 감소에 기인한 것으로 사료된다. 본 항생물질 발효의

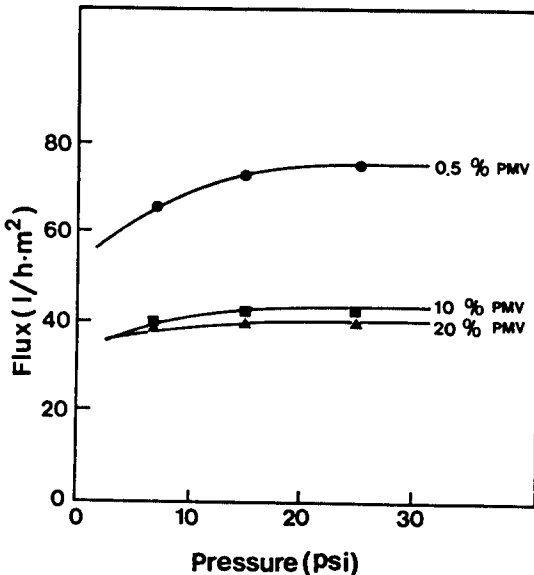


Fig. 3. Effect of transmembrane pressure on the flux.
Temp, 20°C ; Flow rate, 4.3 l/min.

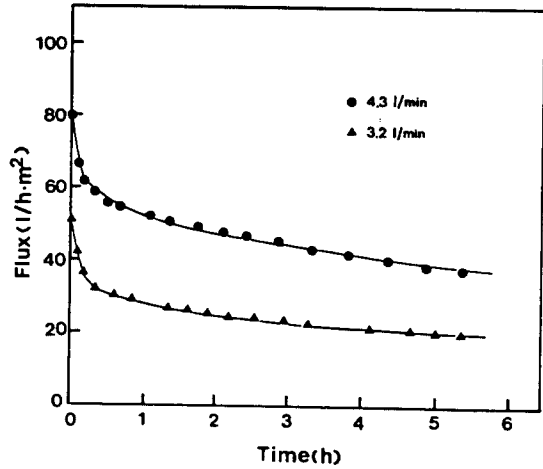


Fig. 4. Effect of flow rate on the flux.
PMV, 20%; Pressure, 7 Psi; Temp, 20°C.

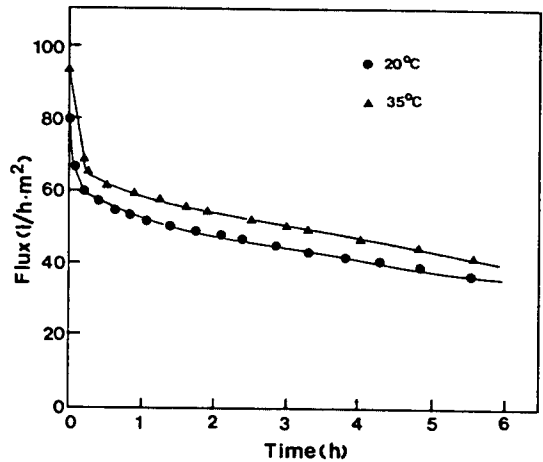


Fig. 5. Effect of temperature on the flux.
PMV, 20% ; Pressure, 7 Psi;
Flow rate, 4.3 l/min.

경우 최적발효온도는 30°C인데 이를 10°C씩 올릴 때마다 약 10% Flux 증가효과가 있으므로 에너지 소비량의 증가를 감안하여 가능한 한 높은 온도에서 막 분리를 실시하는 것이 유리할 것으로 보인다.

PMV: 막을 이용한 균체 분리시 균체농도가 증가할수록 액의 Viscosity가 증가하므로 따라서 Flux는 감소하는 것이 일반적인 경향이다. 그러나 본 실험에서는 전체적으로는 이와 같은 경향을 보이나 Fig.6에서 보는 바와 같이 PMV가 20% 일때가 10%일 때보다 처음 4시간 동안은 더 높은 Flux를 보여 주었다. 이와 유사한 결과는 Scott 등(14)이 Yeast를 대상으로 한 실험에서도 관찰

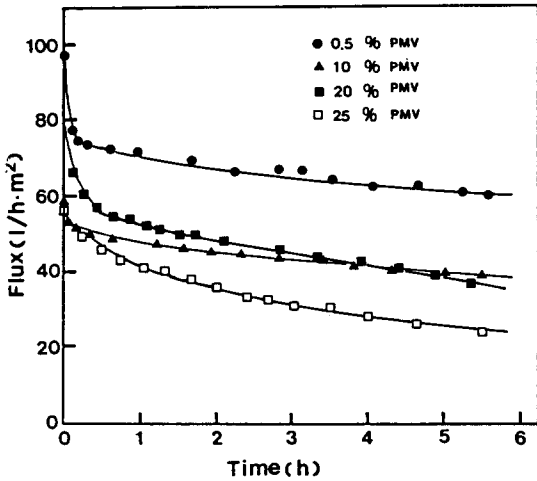


Fig. 6. Effect of cell density (in PMV) on the flux.
 Pressure, 7 Psi ; Temp, 20°C ;
 Flow rate, 4.3ℓ/min.

된 바가 있는데 이들은 이 현상을 액의 농축에 따른 Viscosity 상승에 의해서 TMP가 높아졌기 때문이라고 설명하고 있다. 그러나 본 실험의 경우에는 TMP는 시종 일정하게 유지하여 주었으므로 이와는 다른 원인에 의한 것으로 해석해야만 한다. 균체의 막분리시 발효액 중의 Particle (균사체)들은 막표면에 형성된 Sublayer를 제거해 주는 역할을 해주며 이 효과는 Particle 농도가 높을수록 강한 것으로 알려져 있다(15). 따라서 PMV가 10%에서 20%, 25%로 높아질수록 Sublayer 제거효과가 강하여져서 Flux에 유리한 영향을 미치나 동시에 액의 Viscosity는 점점 상승하게 되므로 반대로 Flux에 불리한 영향을 미치게 된다. 이와 같은 상반된 효과가 Balance를 이루는 지점이 20% 부근의 PMV인 것으로 보여진다. 즉 PMV가 10%에서 20%로 상승할 동안에 Sublayer 제거효과가 Viscosity 증가효과보다 강하여 Flux가 상승했으나 그 이후부터 Viscosity 상승효과가 주도적으로 되어 Flux가 감소하는 것으로 추정된다.

실제로 이와 같은 현상을 이용하여 Ultrafiltration 시 의도적으로 Glass bead 등의 Particle들을 첨가하여 줌으로써 Flux를 높일 수 있다는 보고도 있다(15).

Fouling model

이상과 같이 막분리시 Flux에 대한 영향인자를 검토한 실험 중 관찰된 Flux profile들은 전형적인 Fouling curve에 따랐다. 즉 처음 약 10분 간 급속히 Flux가 떨어진 후 부터는 비교적 완만한 Flux 감소 경향을 보였

다. 이와 같은 Fouling process를 묘사하는 식으로 다음과 같은 Exponential function이 제시된 바 있다(10).

$$J_t = J_1 t^{-b} \tag{2}$$

여기서 J_t 는 시간 t 에서의 Flux이며 J_1 은 $t = 1$ min에서의 Flux b 는 실험적으로 결정되는 Fouling index이다.

식(2)는 ln을 취하면 다음과 같이 된다.

$$\ln J_t = \ln J_1 - b \ln t \tag{3}$$

이 식(3)을 이용하여 식(2)의 본 실험에서의 적합성 여부를 확인해 보고 또한 b 의 값을 구한 것이 Fig.7이다. 이 그림에서 보듯이 대표적으로 뽑은 세 경우 모두 식(3)에 의한 직선적 관계가 잘 성립하며 따라서 식(2)는 본 실험에 적합한 Model이라고 할 수 있다. Table 1은 Fig. 7의 방법을 사용하여 여러가지 조건에서 행한 실험의 Fouling parameter를 구한 것으로 여기서 r 은 상관계수를 나타낸다. 이 결과를 보면 PMV가 0.5%일 때는 조금 다른 경향을 보이나 10% 이상 25% 까지 PMV가 증가할수록 b 값이 증가하여 Fouling 문제가 점점 더 큰 문제로 대두됨을 알 수 있다. 또한 Flow rate가 낮을 수록 높은 Fouling index 값을 가진다.

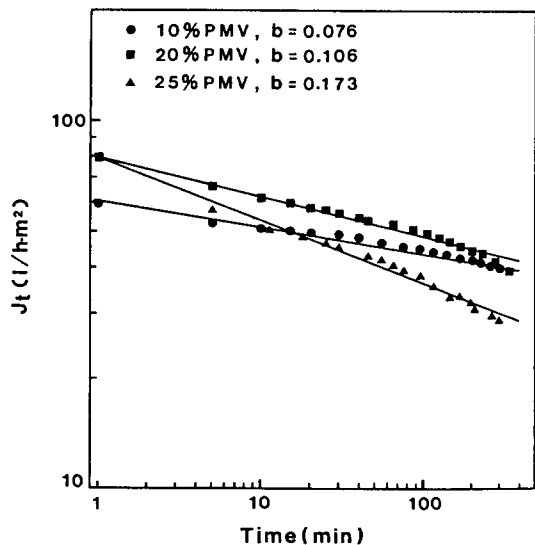


Fig. 7. Examination of the exponential fouling model: $J_t = J_1 \cdot t^{-b}$

Table 1. Fouling parameters for various conditions.

PWV (%)	Pressure (Psi)	Temp (°C)	Flow rate (ℓ/min)	J ₁ (ℓ/min)	J ₃₀₀ (ℓ/min)	Fouling Index(b) (J _t = J ₁ · t ^{-b})	-r
0.5	7	20	4.3	97.4	66.7	0.064	0.942
0.5	15	20	4.3	142.2	73.0	0.090	0.941
0.5	25	20	4.3	161.0	75.0	0.098	0.922
10	7	20	4.3	59.4	39.5	0.076	0.943
10	15	20	4.3	60.5	43.0	0.054	0.960
10	25	20	4.3	62.0	43.0	0.045	0.958
20	7	20	4.3	78.9	39.0	0.106	0.981
20	15	20	4.3	76.3	39.8	0.124	0.981
20	7	35	4.3	93.1	43.5	0.126	0.987
20	7	20	3.2	51.7	20.0	0.159	0.993
25	7	20	4.3	78.7	25.0	0.173	0.986

Diafiltration 에 의한 항생물질 회수

발효액중의 균체제거를 위한 막분리시 Retentate 에 물의 공급없이 지속적으로 농축을 하는 Batch 식의 경우에는 액의 Viscosity 증가 및 Fouling 에 의하여 Flux 가 급격히 감소하게 된다. 이를 막기 위한 방법으로 Diafiltration 을 적용할 경우 Flux 의 증가로 막의 이용효율은 높아지나 물의 추가로 인하여 동일한 항생물질 회수율에도달하는 데에 필요한 여액의 양은 증가하므로 추후의 정제공정의 Load 가 증가하게 된다. 따라서 여액의 증가를 최소화시키면서도 높은 Flux 를 유지하는 방법으로 Batch 식 막분리와 Diafiltration 을 결합한 공정을 쓰는 경우가 많다. 즉 초기에는 Batch 식으로 분리를 실시하여 급격한 Flux 감소가 일어나지 않는 특정한 균사체 농도까지 농축을 한 후 Diafiltration 을 시작함으로써 물의 추가로 인한 제품의 회수율도 최소화시키는 방법이다. 이 때 그 특정한 최적 균사체 농도가 얼마인지는 위에 언급한 제반사항들을 고려하여 결정하여야만 한다.

회수율에 대한 검토: Diafiltration 으로 막분리를 할 경우 여액중으로 회수되는 제품의 회수율은 일반적으로 다음과 같은 식으로 표시될 수 있다(12).

$$Y = 1 - \exp \{(-V_D / V_1) \cdot (1 - \sigma)\} \quad (4)$$

여기서 Y는 회수율, V_D는 Diafiltration 시 추가된 물의 양, V₁는 Diafiltration 전의 Volume, σ는 Rejection coefficient 를 나타낸다. 본 연구에서 MRC 30k

membrane 을 사용하여 균사체 분리를 실시할 경우에도 항생물질의 회수율은 식(4)와 잘 일치하였다 (Fig. 8). 이 그림으로부터 구한 평균 σ 값은 0.14이었다. 단 위의 식(4)는 처음부터 Diafiltration 을 실시할 경우에 적용할 수 있는 식이고 이와는 달리 처음에는 Batch operation

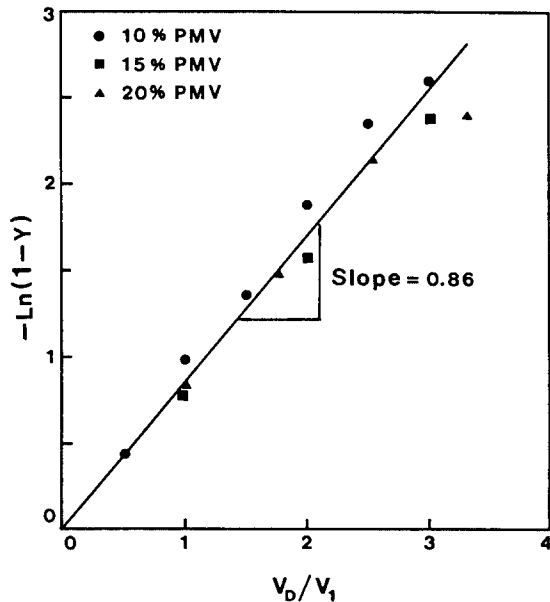


Fig. 8. Examination of the product recovery yield model:
 $Y = 1 - \exp [(-V_D / V_1) \cdot (1 - \sigma)]$

으로 초기 Volume V_0 를 V_1 까지 농축시킨 후 Diafiltration을 실시할 때에는 회수율을 다음과 같이 변형된 식으로 나타낼 수 있다.

$$Y = 1 - (V_1/V_0)^{1-\sigma} \cdot \exp \{(-V_D/V_1) \cdot (1-\sigma)\} \quad (5)$$

여기서 V_0, V_1, V_D 그리고 V_p (Permeate volume) 간에는 다음과 같은 관계가 성립한다.

$$V_P = V_0 - V_1 + V_D \quad (6)$$

Diafiltration의 효과: Fig.9에서 보는 바와 같이 10% PMV인 초기용액을 지속적으로 농축할 경우의 Flux profile은 그 특성에 따라 세 구간으로 나눌 수 있었다. 첫째 구간에서는 약 10분간 급속한 Flux의 감소가 나타나는 구간으로써 막표면의 Sublayer 형성에 기인한 현상이고 둘째 구간에서는 거의 일정한 Flux가 유지되는데 농축에 따른 Viscosity의 증가, Sublayer 두께의 증가, Fouling의 증가등 Flux 감소요인과 앞서 언급한 바 있는 액중의 Particle에 의한 Sublayer 파괴에 따른 Flux 증가요인이 균형을 이루고 있기 때문으로 해석된다. 이 구간을 지나서 지속적으로 농축을 실시할 경우에는 Fouling 현상이 심화되어 급속한 Flux 감소가 수반

되는 세번째 구간에 들어가게 된다. 이와 유사한 Flux profile은 *E.coli*의 막분리에서도 관측된 바 있다(5). Diafiltration은 이 세번째 구간에 들어가기 전에 시행하여야 하며 그렇게 함으로써 Fouling 현상을 최소화하여 Flux 감소속도를 완만하게 할 수 있다.

최적 Diafiltration 시점에 대한 검토: 앞서 밝힌대로 Concentration과 Diafiltration이 결합된 공정에서는 어느 시점에 Diafiltration을 시작할 지를 결정하는 것이 중요하다. 빨리 시작할수록 평균 Flux는 높으나 물의 첨가량이 많아져 처리해야 할 Volume이 늘어나고 또한 회수해야 할 제품도 더 희석이 된다. Fig.10은 10%의 초기 PMV를 가진 발효액을 처음부터 Diafiltration을 했을 경우와 15%, 20% 및 25%의 PMV로 농축 후 Diafiltration을 실시할 경우의 Flux profile을 나타낸 것이다. 이 결과를 보면 농축을 많이 할수록 그 이후 Diafiltration시 Flux가 낮아짐을 알 수 있다. Table 2는 같은 실험에 대하여 일정한 Permeate volume에 도달하는데 걸리는 시간과 이 때의 Product recovery yield를 나타낸 것으로 Fig.10의 관계를 다른 식으로 설명해 주고 있다. 즉 Diafiltration 시작 PMV가 높을수록 평균 Flux가 낮아지므로 일정 Permeate volume에 도달하는데 걸리는 시간은 길어진다. 그러나 Table 2의 Recovery yield를 보면 같은 Permeate volume에 대해서 Diafiltration 시작 PMV가 높을수록 Recovery yield는

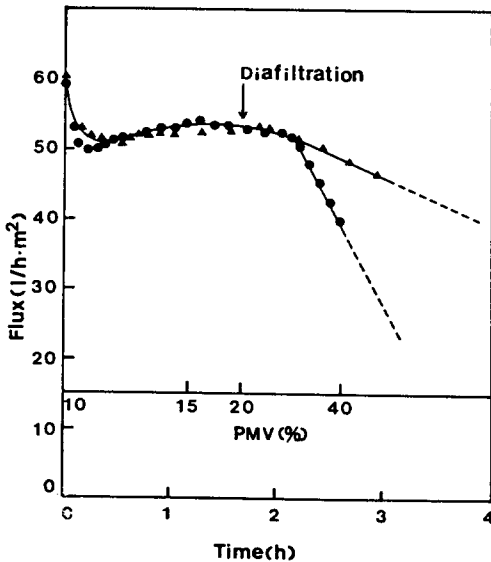


Fig. 9. Comparison of flux profiles between the case with diafiltration (▲) and without diafiltration (●).
Initial volume, 8 l; Initial PMV, 10%;
Pressure, 7 Psi; Temp, 20°C;
Flow rate, 4.3 l/min.

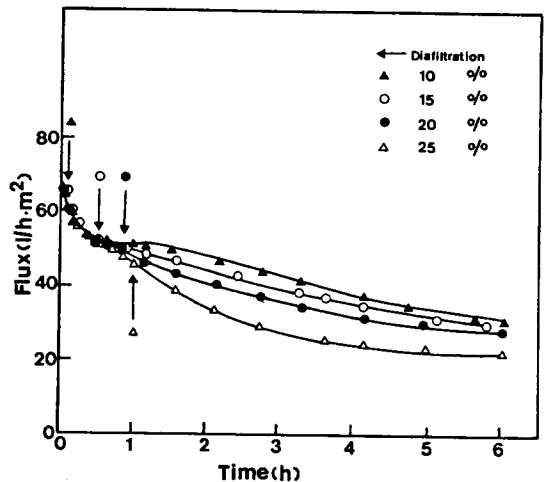


Fig. 10. Effect of the diafiltration strating point on the flux profile in the combined concentration/diafiltration process.
Initial volume, 4l; Initial PMV, 10%;
Pressure, 7 Psi; Temp, 20°C;
Flow rate, 4.3 l/min.

Table 2. Effect of diafiltration starting PMV on the operation times to reach specific permeate volumes and corresponding recovery yields.

V_p (ℓ)	V_p/V_o	Operating time (h)					Recovery yield (%)			
		PMV	10%	15%	20%	25%	10%	15%	20%	25%
2	0.5		0.8	0.8	0.9	0.9	35.1	42.7	49.4	49.4
4	1.0		1.4	1.6	1.9	2.4	62.4	70.1	77.0	77.4
6	1.5		2.8	2.9	3.0	3.3	74.1	84.4	89.4	89.7
8	2.0		3.7	4.0	4.3	4.9	84.6	91.9	93.0	94.6
10	2.5		5.1	5.4	5.9	6.8	90.4	93.8	96.0	97.4
12	3.0		6.7	6.9	7.4	8.7	92.5	96.3	98.5	98.8

V_p : permeate volume
 V_o : initial broth volume

높아진다. 이 관계를 역으로 설명하면 초기에 농축을 많이 할수록 특정한 Yield를 얻는데 필요한 Permeate의 부피는 줄어든다고 말할 수 있다. 따라서 농축이 많이 된 경우에는 비록 Flux는 낮아지더라도 Permeate의 절대량이 줄어들기 때문에 특정한 Recovery yield에 도달하는데 필요한 시간은 줄어들 수도 있다. 이 관계를 정량적으로 나타낸 것이 Fig.11로서 Diafiltration 시작 PMV가 각각 10%, 15%, 20%, 25% 일 때의 98% Recovery yield에 도달하기 위한 시간과 Permeate의 양을 Plot해 본 것이다. 이 결과를 보면 PMV가 20%에 도달하는 시점에서 Diafiltration을 시작하는 것이 98% Yield에 가장 빨리 도달할 수 있으며 또한 더 이상 농축하더라도 Permeate volume이 크게 감소하지 않으므로

최적점인 것을 알 수 있다.

요 약

항생물질 발효액의 균사체 분리에 있어서 Modified regenerated cellulose 막을 이용한 Cross-flow filtration으로 높은 Flux를 얻을 수 있었다. 막분리시 가급적 높은 유속, 높은 온도, 특정 균사체농도 (약 20% PMV)에서 높은 Flux를 보여 주었으며 Fouling 정도는 균사체 농도가 높을수록 또한 유속이 낮을수록 심각한 것으로 나타났다. 발효액을 농축 분리할 때의 Flux profile은 1단계 Sublayer 형성에 의한 급속감소, 2단계 평형, 3단계 Fouling에 의한 급속감소의 세 구간으로 나눌 수 있었으며 Diafiltration의 적용으로 3단계의 Flux 감소 현상을 현저히 완화시킬 수 있었다. 한편 Diafiltration에 의한 항생물질 회수시 초기부터 Diafiltration하는 것보다는 특정 PMV까지 농축시킨 후 Diafiltration하는 경우에 작업시간과 여액의 Volume을 최소화 할 수 있었으며 본 실험에서는 98%의 회수율을 얻기 위해서 Diafiltration을 시작하는 Optimum PMV는 20%였다.

참 고 문 헌

1. A.V. Quirk and J.R. Woodrow (1983), *Biotechnol. Lett.*, **5**(4), 277.
2. R. Datar (1985), *Biotechnol. Lett.*, **7**(7), 471.
3. G.B. Tanny, D. Mirelman and T. Pistole (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**(2), 269.
4. W.K. Nielsen and S. Kristensen (1983), *Process Biochem.*, **18**, 8.
5. K.H. Kroner, H. Schutte, H. Hustedt and M.R. Kula

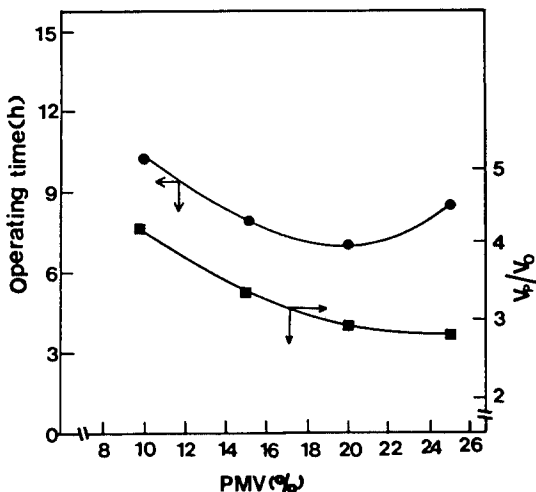


Fig. 11. Determination of optimum diafiltration starting point.

- (1984), *Process Biochem.*, **19**, 67.
6. D.E. Brown and P.R. Kavanagh (1987), *Process Biochem.*, **22**, 96.
 7. P. Gatenholm, S. Paterson, A.G. Fane and C.J.D. Fell (1988), *Process Biochem.*, **23**, 79.
 8. H.K. Lonsdale (1982), *J. Membrane Sci.*, **10**, 81.
 9. T.H. Lim, W.L. Dunkley and R.L. Merson (1971), *J. Dairy Sci.*, **54**, 306.
 10. K.P. Kuo and M. Cheryan (1983), *J. Food Sci.*, **48**, 1113.
 11. P.N. Patel, M.A. Mehaia and M. Cheryan (1987), *J. Biotechnol.*, **5**, 1.
 12. R.S. Tutunjian (1985), *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press, UK, 411.
 13. P.J. Skudder, F.A. Gloven and M.L. Green (1977), *J. Dairy Sci.*, **44**, 293.
 14. J.A. Scott (1988), *Process Biochem.*, **23**, 146.
 15. H.J. Bixter and G.C. Rappe (1970), U.S. Patent 3,541,006.

(Received June 14, 1989)