

해수배지를 이용한 해양 미생물의 Linoleic acid 생성 특성 규명

김수정 · 박경원 · 허병기
인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 2000. 4. 14., 게재승인 : 2000. 4. 21.)

Characteristics of Linoleic Acid Production by Marine Fungi in Sea Water Media

Su-Jung Kim, Kyung-Won Park, and Byung-Ki Hur†
Department of Biological Engineering Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2000. 4. 14., Accepted : 2000. 4. 21.)

Studies were made on the optimization of media to cultivate *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 for the enhanced production of linoleic acid. The medium optimization was made with the artificial sea water medium. Yeast extract, sodium glutamate, peptone and tryptone were considered as nitrogen source. The effect of concentration of nitrogen source as well as initial glucose on the production of linoleic acid were investigated to optimize the media. The maximum yield of lipid was 0.302 mg/g cell mass when initial glucose concentration was 10 g/L and sodium glutamate was used as nitrogen source, and the yield of linoleic acid to unit cell mass was also maximum to be 8 % in that case. The highest linoleic acid concentration was obtained in the initial glucose concentration 30 g/L regardless of the kinds of nitrogen source and the linoleic acid concentration was 0.208 g/L when peptone was supplemented to be 2 g/L.

Key Words : Omega-6 fatty acid, linoleic acid, polyunsaturated fatty acid, artificial sea water

서론

Linoleic acid와 linolenic acid는 생물체가 필요로 하나 자체 내에서는 합성할 수 없기 때문에 음식물로 섭취해야 하는 필수 지방산이다. Linoleic acid는 2개의 이중 결합을 갖는 18개의 탄소로 구성되어 있고(18:2), linolenic acid는 3개의 이중 결합을 갖고 있는 물질이다(18:3). Linoleic acid는 생체내에서 plasma low density lipoprotein과 cholesterol의 수치를 낮추어 주며(1,2), 생체막 구조와 기능에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(3). 또한 음식물로 섭취되는 linoleic acid와 linolenic acid는 그 밖의 불포화 지방산의 합성을 위한 전구체로 사용된다(4). α -linolenic acid는 EPA(20:5 ω 3)와 DHA(22:6 ω 3)의 전구체이며, linoleic acid에서 유도되는 arachidonic acid(20:4 ω 6)는 eicosanoids hormones같은 매우 활성이 큰 신호 분자들의 전구 물질이다(5). Eicosanoids hormones는 cyclooxygenase에 의해 생성되는 prostaglandins와 thromboxanes가

있고, lipoxygenase의 작용에 의해는 leukotrienes로 전환될 수 있다. prostaglandins의 작용은 염증의 자극, 특정 기관으로의 혈액 흐름의 조절, 막을 가로질러 일어나는 이온 운반의 조절 및 시냅스 전달을 조절한다(6). ω -6 지방산인 linoleic acid와 arachidonic acid등의 필수 지방산의 생체 결핍에서 나타나는 증상들은 문헌(7)에 잘 정리되어 있다.

Omega-6 fatty acid는 동물이 자체적으로 생산할 수 없는 필수 지방산이므로 음식을 통해 체내에서 필요한 다중 불포화 지방산을 충족시켜야 한다. 이러한 다중 불포화 지방산은 바다에서 서식하는 미생물인 algae, fungi 또는 bacteria가 생산하여 체내에서 에너지원으로 저장하거나 몸체의 구성 요소로 사용한다. 따라서 해양 미생물을 인공적으로 배양함으로써 인류가 필요로 하는 높은 순도의 linoleic acid를 포함하는 다중 불포화 지방산을 생산하려는 연구가 시작되었다. 다중 불포화 지방산이 인간에게 미치는 여러 유용한 생리학적·영양학적 효과들에 대한 외국의 연구들이 활발하며, 특히 질병 치료·예방 효과에 관련된 의학적 보고는 매년 수백 편에 달하고 있는 실정이다. 현재 국내에서 다중 불포화 지방산의 생산 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 회분식 발효를 통하여 해수를 이용한 배지에서 질소원의 농도와 종류 및 탄소원의 농도를 변화시켜 발효 시간과 각 질소원의 농도 변화 및 초기 당 농도 변화에 따른 linoleic acid 생산 특성을 규명하였다.

†Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7512, Fax : 032-875-0827
E-mail : biosys@inha.ac.kr

재료 및 방법

균 주

본 연구에서 사용한 균주는 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304로 미국에서 직접 분양받았다. 균주의 활성을 유지하기 위하여 두 주일 단위로 사면 배지와 평판배지에 계대배양한 후 4℃에서 냉장 보관하면서 접종용 균주 배양에 사용하였다.

배지조성

접종용 균주 배양을 위한 배지 조성은 Solomon Goldstein(8)이 사용한 배지 조성을 부분 보완한 조성으로 배지 1 l 내의 각 성분의 함량은 NaCl 25 g, MgSO₄·7H₂O 5 g, KCl 1 g, KH₂PO₄ 0.1 g, CaCO₃ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, Sodium glutamate 2 g, Thiamine-HCl 10μg, NaHCO₃ 0.1 g, Vitamine B₁₂ 1 μg, glucose 20 g, Yeast Extract 2 g이었다. *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304의 발효 특성을 규명하기 위한 배지 조성은 Table 1.의 바닷물의 성분을 기본으로 하고 포도당을 25 g/l로 고정된 후 질소원의 종류를 Yeast Extract, sodium glutamate, peptone, tryptone으로 변화시킨 후 각각의 농도를 0.5 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l, 4 g/l로 변화시킨 20 종류의 배지 조성에 대한 발효 실험과, 포도당을 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l로 변화시키고 질소원의 종류를 위의 네 가지로 변화시킨 또 다른 20개의 배지 조성에 대한 발효 실험을 수행하였다. 이 경우 각 질소원의 농도는 2 g/l이었다. 발효 초기 pH는 1 N HCl과 1 N NaOH용액을 사용하여 6.0으로 조절하였다.

발효조건

본 연구에서는 250 mL Erlenmeyer flask내에 배지 120 mL를 주입한 후, 회전식 진탕 배양기를 사용하여 발효 실험을 수행하였다. 작동 온도는 25℃, 회전수는 200 rpm이었다. 접종용 균주 배양 시간은 40시간이었으며, 발효 특성 규명을 위한 배양시간은 9일이었다. 시료는 같은 배지 조성을 각각 2개로 하여 배양한 후 1, 3, 5, 7일 및 9일에 각각 30 mL를 취하여 10 mL는 건조균체 측정용, 20 mL는 분석에 사용하였다.

시료의 분석

시료 채취 후, 즉시 시료가 담긴 시험관을 4000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액은 잔당 분석에 사용하였고

침전물은 균체 농도 및 fatty acid 분석에 사용하였다. 세포 농도는 aluminum boat를 사용하여 측정하였다. 시험관내에 침전된 균체를 2내지 3회 증류수로 세척하여 무게를 알고 있는 aluminum boat로 이동시킨후, 85℃ 건조기에서 항량이 될 때까지 20시간 이상 건조시킨 후 무게를 측정하였다. 포도당의 농도는 Glucose Analyzer(TOA, GLU-11, Japan)을 사용하여 측정하였다. 균주가 생산한 fatty acids 조성은 생산 fatty acids를 Lepage가 사용한 방법(9)을 변형하여 fatty acid methyl esters로 전환시키고 heptadecanoic acid(17:0)를 기준 물질로 하여 gas chromatography(HP 6890)로 분석하였다.

Detector로는 FID를 사용하였고 HP-5(Crosslinked 5% PH ME Siloxane, 30 m×0.32 mm×0.26 μm) capillary column을 사용하였다.

결과 및 고찰

질소원에 따른 총 Lipid내 각 Fatty acid의 함량

Table 2.는 *M. hiemalis* IPD 51과 *M. circinelloides* v. *Tieghem* IPD 155에 의해 생산되어지는 lipids의 fatty acid 조성(10)과 본 실험에 사용된 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304의 lipids내 fatty acid조성을 비교하여 나타내었다. *M. hiemalis* IPD 51과 *M. circinelloides* v. *Tieghem* IPD 155 균주와 비교하여 oleic acid(C18:1 ω9)와 linoleic acid(C18:2 ω6)의 함량이 많은 것을 알 수 있다.

질소원에 따른 초기 당 농도와 lipids의 생산 특성 규명

Figure 1.은 네 종류의 질소원에 대한 초기 당 농도와 생성된 균체내의 lipid 함량 사이의 관계를 나타내고 있다. 균체중 lipid의 중량 비율은 1내지 30%로 질소원의 종류에 따라 크게 달랐으며, sodium glutamate를 질소원으로 사용한 경우가 yeast extract와 tryptone을 사용한 경우보다 최대 25배까지 높았으며 초기 당농도와는 함수 관계를 나타내지 않았다. 이 분석 결과에 의하면 질소원으로는 sodium glutamate를 사용하고 초기 당 농도가 10 g/l일 경우 균체내의 총 lipid의 중량 비율이 최대값(302 mg/l)을 나타내었다.

Figure 2.는 균체중 linoleic acid의 중량 비율을 나타내고 있다. 이 결과 역시 lipid 중량 비율의 결과와 비슷한 경향을 나타내고 있다. 균체를 구성하고 있는 linoleic acid의 중량 비율은 초기 당 농도 40 g/l이하에서 질소원으로 yeast extract, tryptone을 사용하였을 때는 1% 미만의 값을 나타내었으며 sodium glutamate를 사용하였을 때는 최대 8%의 값을 나타내었다. 그러나 초기 당 농도와는 함수 관계를 나타내지 않았다.

Table 1. Artificial sea water

NaCl	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂ ·2H ₂ O	KCl	NaNO ₃	K ₂ HPO ₄
24g	12g	1g	0.75g	0.04g	0.001g
tris	Na ₂ EDTA	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	FeCl ₃ ·6H ₂ O	MnCl ₂ ·4H ₂ O
1g	12mg	2mg	1mg	0.5mg	0.2mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Thiamine Hydrochloride	p-amino benzoate	Calcium pantothenate	Cyanocobalamin
2 μg	2 μg	300 μg	20 μg	10 μg	4 μg

Table 2. Fatty acid profiles of oils produced by *M. hiemalis* IPD51, *M. circinelloides* v. *Tieghems* IPD 155 and *T. aureum* ATCC 34304.

Fatty acid	Fraction of total oil(%)						
	<i>M. hiemalis</i> IPD51	<i>M. circinelloides</i> v. <i>Tieghems</i> IPD 155	<i>T. aureum</i> ATCC 34304				
			Yeast extract	Sodium glutamate	Peptone	Tryptone	
C _{14:0}	1.4	3.5	-	-	-	-	
C _{16:0}	25.2	25.8	13.6	23.3	15.8	16.8	
C _{16:1}	0.8	0.8	-	-	8.2	-	
C _{18:0}	9.6	8.3	-	tr	-	-	
C _{18:1 ω 9}	32.4	37.5	49.7	47.9	42.3	44.5	
C _{18:1 ω 7}	0.2	-	-	-	-	-	
C _{18:2 ω 6}	11.9	13.8	36.7	28.8	41.1	38.7	
C _{18:3 ω 3}	15.4	7.5	-	-	-	-	
C _{20:2}	-	-	-	tr	-	-	
C _{20:2}	0.5	0.5	-	-	tr	tr	
C _{22:0}	0.8	1.0	-	-	-	-	
C _{24:1}	1.7	1.3	-	-	-	-	

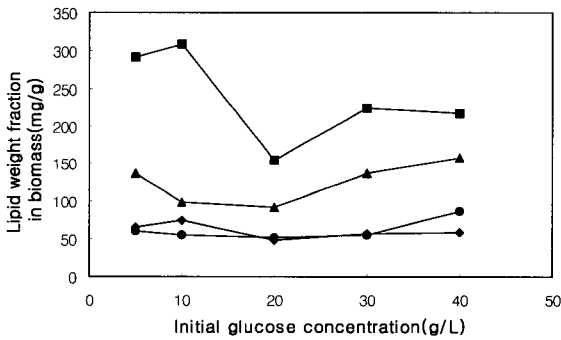


Figure 1 Effect of initial glucose concentrations on lipid fraction in biomass. ● Yeast extract ■ Sodium glutamate ▲ Peptone ◆ Tryptone.

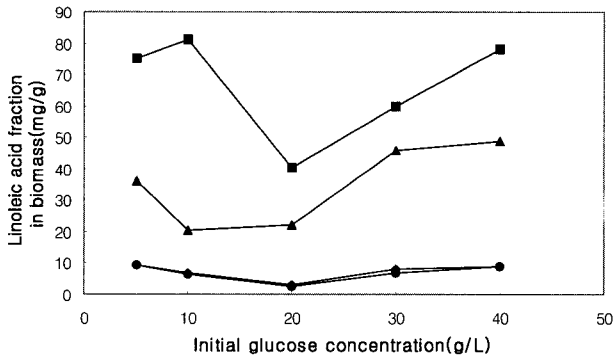


Figure 2. Effect of initial glucose concentrations on linoleic acid fraction in biomass. ● Yeast extract ■ Sodium glutamate ▲ Peptone ◆ Tryptone.

Figure 3.은 linoleic acid 생성 수율과 linoleic acid 생성 농도를 나타내고 있다. Linoleic acid 생성 수율은 sodium glutamate가 다른 경우에 비하여 다소 높은 값을 나타내었으며 linoleic acid 생성 농도는 peptone과 sodium glutamate가 다른

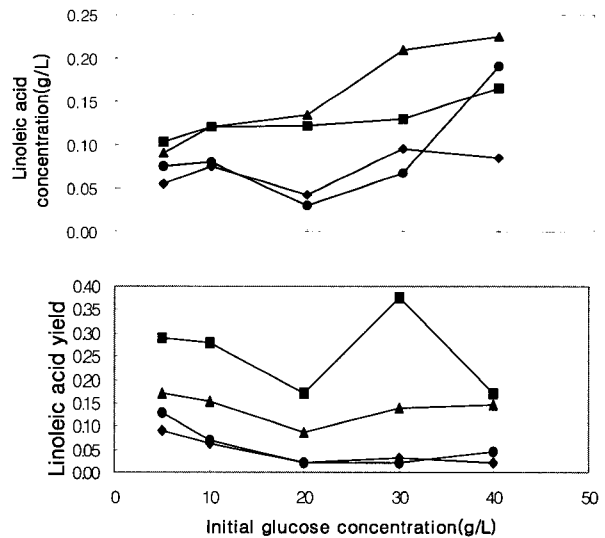


Figure 3. Effect of various initial glucose concentrations on the linoleic acid yield and concentration. ● Yeast extract ■ Sodium glutamate ▲ Peptone ◆ Tryptone

질소원에 비해 최대 2.5배까지 높은 수치를 나타내었다. 당 농도 10내지 40 g/l 사이에서 linoleic acid 생성 농도가 최대가 되는 당 농도는 40 g/l이었으며 당 농도 30내지 40 g/l에서 거의 일정한 값을 나타내었다.

Figure 4.은 총 lipid에 대한 linoleic acid의 중량 분율을 나타내고 있다. 총 lipid에 대한 linoleic acid의 중량 분율은 초기 당 농도, 질소원의 종류에 관계없이 15~40 % 사이로 나타났다.

질소원에 따른 질소원 농도와 lipid 생산 특성 규명

Figure 5.는 세 종류의 질소원에 대한 질소원의 농도와 생

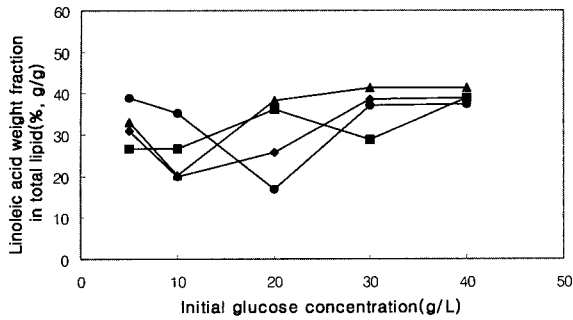


Figure 4. Effect of initial glucose concentrations on linoleic acid fraction in total lipid. ● Yeast extract ■ Sodium glutamate ▲ Peptone ◆ Tryptone.

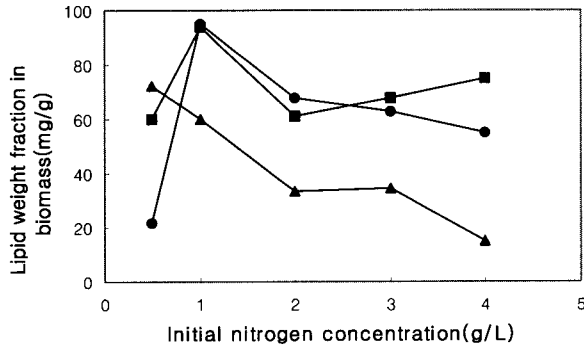


Figure 5. Effect of initial glucose concentrations on lipid weight fraction in biomass. ● Sodium glutamate ■ Peptone ▲ Tryptone.

성된 균체내의 lipid 함량 사이의 관계를 나타내고 있다. 균체 중 lipid의 중량 비율은 1~9 %로 질소원의 종류 및 질소원 농도에 따라 다르게 나타났다. Peptone과 sodium glutamate를 사용하였을 때 균체 중 lipid 중량 비율은 비슷한 경향을 나타내었으며 질소원 농도 1.0내지 4.0 g/l에서 2배 이상 높은 값을 나타내었다. 이 분석 결과에 의하면 질소원 sodium glutamate(peptone)을 사용하고 초기 질소원 농도가 1.0 g/l일 때 균체내의 총 lipid의 중량 비율이 최대값인 94.2 mg/g (93.2 mg/g)을 나타내었다.

발효 시간에 따른 lipid 생산 특성 규명

Figure 6.은 질소원으로 sodium glutamate를 사용하여 발효를 수행하였을 때의 발효 시간에 따른 균체 농도와 linoleic acid 농도 변화를 나타내고 있다. 발효 시간에 따라서 linoleic acid의 농도는 증가 경향을 나타내어 180시간 이후 초기당 30 g/l에서 최대 200 mg/l까지 상승하였다. 동일한 발효 시간에서 linoleic acid의 농도는 초기당 40 g/l, 20 g/l, 30 g/l의 순으로 큰 값을 나타내었다. 초기 당 20 g/l와 30 g/l에서 균체 농도 변화와 linoleic acid 농도 증가를 살펴보면 균체 농도가 크게 증가하는 시간 동안 linoleic acid 농도가 완만히 증가하다가 균체의 성장이 멈추는 시기 이후에 꾸준히 증가하는 것을 알 수 있었다. Figure 7.은 질소원으로 yeast extract와 tryptone을 사용하였을 때 발효 시간에 따른 linoleic acid와 oleic acid의 비율을 나타내고 있다. 초기 당 농도 5내지 10 g/l에서는 발효 40~80시간까지 oleic acid에

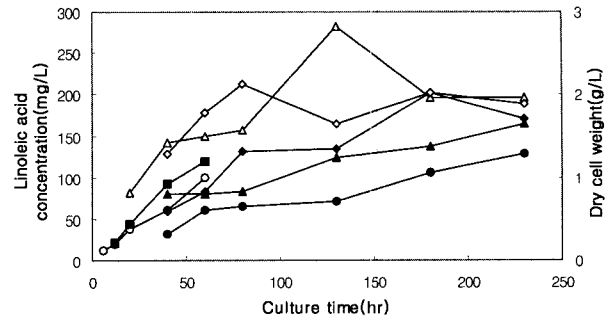


Figure 6. Relationship between linoleic acid concentration, dry cell mass and culture time at various initial glucose concentration

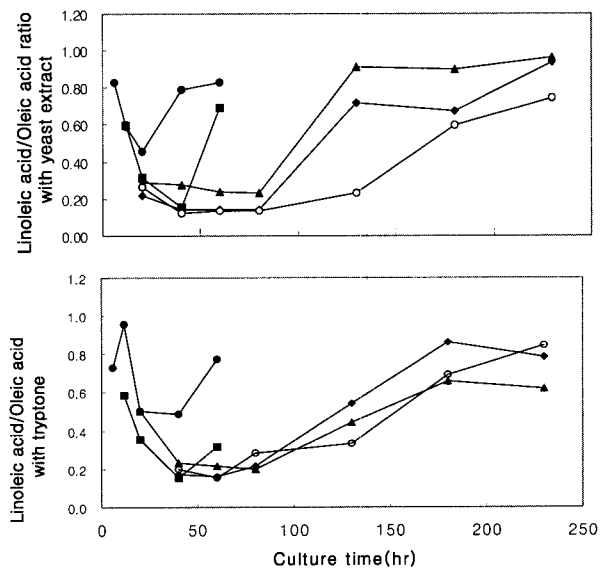


Figure 7. Relationship between linoleic acid/oleic acid and fermentation time in various initial glucose concentrations with yeast extract, tryptone ● Glucose 5g/L ■ Glucose 10g/L ▲ Glucose 20g/L ◆ Glucose 30g/L ○ Glucose 40g/L.

대한 linoleic acid의 비율이 급격히 감소하다가 그 이후 증가하는 것을 알 수 있었다. 초기 당 농도 20 g/l 이상에서 linoleic acid와 oleic acid의 비율을 살펴보면 발효 80시간까지는 천천히 감소하다가 그 이후 급격한 증가를 보여서 발효 200시간 이후에는 80시간에서의 값보다 5배 정도 큰 값을 나타내었다. 배양 초기 oleic acid에 대한 linoleic acid의 비율이 감소하는 것은 균체 성장이 정점에 달하는 20내지 40시간까지(초기 당 농도 20 g/l 이상에서는 발효 80시간까지) linoleic acid의 생산이 크게 증가되지 못하다가 그 이후 증가하는 것으로 생각되었다.

Figure 8.은 질소원으로 sodium glutamate와 peptone을 사용하였을 때의 발효 시간에 따른 linoleic acid와 oleic acid의 비율을 나타내고 있다. 초기 당 농도 20 g/l 이상에서 oleic acid에 대한 linoleic acid의 비율을 살펴보면 발효 시간의 증가에 따라 완만한 증가를 나타내어 발효 200시간 이후에는 80시간에서의 값보다 2배 정도 큰 값을 나타내었다. 위의 결과로부터 발효 시간에 따라서 oleic acid에 대한 linoleic acid의 비율은 증가 경향을 보였으며, 최종적인 비율은 0.9 정도로 질소원에 관계없이 모두 비슷하였다.

Table 3. Effect of Nitrogen source on LA Production by *T. aureum* ATCC 34304.

Nitrogen source ^a	Biomass (g/L)	Lipids in biomass (%, w/w)	LA		
			in biomass (mg/g)	in lipids (%, w/w)	Yield (mg/L)
Yeast extract	10.07	1.84	6.74	36.66	67.98
Sodium glutamate	2.20	20.59	59.39	28.85	131.54
Peptone	4.57	11.04	45.40	41.11	208.39
Tryptone	11.88	2.07	8.02	38.71	95.36

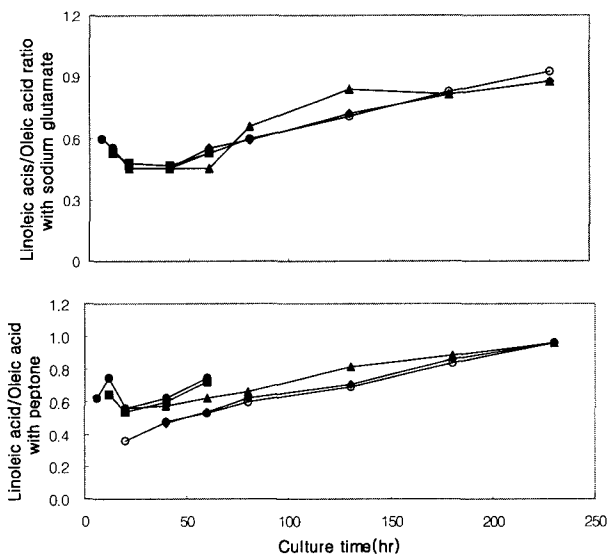


Figure 8. Relationship between linoleic acid/oleic acid and fermentation time in various initial glucose concentrations with sodium glutamate, peptone ● Glucose 5g/L ■ Glucose 10g/L ▲ Glucose 20g/L ◆ Glucose 30g/L ○ Glucose 40g/L.

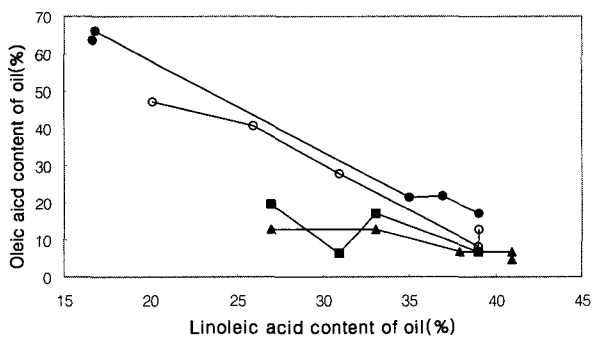


Figure 9. Relationship between oleic acid and linoleic acid contents of oil ● Yeast extract ■ Sodium glutamate ▲ Peptone ◆ Tryptone.

Figure 9.는 총 lipid내의 oleic acid와 linoleic acid사이의 함량관계를 나타내고 있다. Kennedy는 gamma linoleic acid (GLA)의 생산 속도가 일정하다고 하면 균체내의 lipid 함량이 증가할 때 GLA 생산은 감소가 되고, GLA precursor의 농도는 lipid 함량이 증가할수록 증가함을 가정하였다. 이러한 가정을 토대로 Kennedy는 *M.hiemalis* IPD 51에 의한 lipid 생

산 실험에서 lipid내의 oleic acid와 lipid내의 GLA함량이 역상관성을 띠고 있음을 증명하였다(11). 본 실험에서도 lipid내의 linoleic acid precursor인 oleic acid와 linoleic acid의 함량이 역상관성을 보일 뿐만 아니라 질소원의 종류에 따라서 역상관성의 크기가 차이를 보여주고 있다. 가장 큰 역상관성을 보이는 질소원은 tryptone이었다. 위의 분석 결과로부터 oleic acid에 대한 linoleic acid의 전환 관계를 살펴보면 질소원 yeast extract와 tryptone에서의 전환율이 컸으나 linoleic acid 수율 및 중량 비율, 농도 등은 sodium glutamate와 peptone에서 절대적으로 큰 수치를 나타내었다.

Table 3.은 각 질소원의 농도를 2 g/l, 초기 당 농도를 30 g/l로 하였을 때 각 질소원에 대한 균체 내 lipid 중량 비율, 균체 내 linoleic acid 중량 비율, 총 lipid내 linoleic acid의 fraction, linoleic acid의 yield등을 나타내고 있다.

요 약

네 종류의 질소원 yeast extract, sodium glutamate, peptone, tryptone과 각 질소원의 농도 및 포도당의 초기 농도가 해양 미생물 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304의 linoleic acid 생산성에 미치는 영향을 규명하여 다음의 결과를 얻었다. 초기 당 농도를 10 g/L로 하고 질소원으로는 sodium glutamate를 사용하였을 때 균체 단위 질량에 대해 생성된 지질의 중량 비율이 최대값 0.302 mg/g를 나타내었으며, 균체에 대한 linoleic acid 중량 비율도 8 %로 최대값을 나타내었다. Linoleic acid의 생성속도는 질소원으로 peptone과 sodium glutamate를 사용하였을 경우 다른 질소원을 사용하였을 때 보다 2.5 배까지 높은 수치를 나타내었다. 초기 당 농도가 증가하면 linoleic acid의 생산성은 상승하나 당 농도 30 g/L 이상에서는 그 상승폭이 대단히 완만하였다. 초기 당 농도가 30 g/L인 경우 질소원으로 peptone을 사용하였을 때는 linoleic acid의 생산량이 200 mg/L, sodium glutamate를 사용하였을 때는 130 mg/L를 나타내었다. 질소원의 농도가 증가하면 균체 내에 생성되는 지질의 양도 증가하는 경향을 나타내었다. 질소원이 sodium glutamate인 경우 농도 1 g/l까지는 지질의 함량이 뚜렷한 증가현상을 나타내었으나 농도 1.0 내지 2.0 g/L 사이에서는 지질 생성량이 완만하게 증가하였으며, 2.0 g/L 이상에서는 질소원의 농도가 증가하면 지질의 생성량이 감소하였다.

REFERENCES

1. Henning, B., M. Toborek., S. J. Barve., S. W. Barger., S. Barve, M. P. Mottson, and C. J. McClain (1996), Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kB(NF-kB) and induces NF-kB-dependent transcription in cltures endothelial cell, *Am. J. Clin. Nutr.*, **63**, 322-328.
2. Insull Jr w., A. Silvers, L. Hicks and J. L. Probstfield (1994), Plasma lipid effects of three common vegetable oils in reduced-fat diets of free-living asults, *Am. J. Clin. Nutr.*, **60**, 195-202.
3. Suh, M., AA. Wierzbicki, E. Lien, MT. Clandinin (1996), Relationship between Dietary supply of Long-Chain Fatty acids and Membrane composition of Long- and very Long Chain Essential fatty acids in developing Raethotoreceptors, *Lipids*, **31**(1), 61-64.
4. Salem, N., B. Wegher, P. Mena, and R. Uauy (1996), Arachidonic and Docosahexaenoic acids are Biosynthesized from their 18-carbon Precursors in Human infants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(1), 49-54.
5. Noguchi, M., M. Earashi, M. Minami, K. Kinoshita, and I. Miyazaki (1995), Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic acid on cell growth and Prostaglandine and Leukotriene Production by a Human Breast Cancer Cell Line(MDA-MB-231), *Oncology*, **52**(6), 458-464.
6. Stryer, L. (1988), *Biochemistry*, 3rd ed., p991-992, Freeman, New York.
7. Gurr, M. I. and J. L. Harwood (1991), *Lipid Biochemistry*, 4th ed., p66, Chapman & Hall, London.
8. Solomon Goldstein (1963), Development and Nutrition of new Species of *Thraustochytrim*, *Am. J. Bot.* **50**, 271-279.
9. Lepage, G. and C. C. Roy (1984), Improved Recovery of Fatty Acid Through Direct Transesterification without Prior Extraction or Purification, *J. Lipid Res.* **25**, 1391-1396.
10. Ratledge, C. (1992), *Microbial lipids*, 1-15, In: Kyle D. 2 J. and Ratledge C.(eds), *Industrial applications of single cell oil*. American Oil Chemists Society.
11. Kennedy, M. J., S. L. Reader, and R. J. Davies (1993), FA production characteristics of fungi with particular Emphasis on Gamma Linoleic Acid Production, *Biotech. Bioeng.*, **42**, 625-634.