

Spirulina platensis NIES 39의 성장을 위한 최적배양조건

김영민 · 김미령* · 권태호** · 하종명 · 이재화†

신라대학교 공과대학 생명공학과, *신라대학교 의생명과학대학 바이오식품소재공학과, **전주생물소재연구소
(2009년 2월 12일 접수, 2009년 3월 10일 채택)

Optimum Culture Conditions for the Growth of *Spirulina platensis* NIES 39

Young Min Kim, Mi-Ryung Kim*, Tae Ho Kwon**, Jong-Myung Ha, and Jae-Hwa Lee†

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea

*Department of Bio-Food Materials, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

**Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju 561-360, Korea

(Received February 12, 2009; accepted March 10, 2009)

최근 지구온난화 및 식량문제에 대한 관심이 증대되면서 그 해결책으로 미세조류에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 광합성 미세조류 *Spirulina platensis*는 이산화탄소를 고정할 수 있으며, 영양적 가치가 우수하여 많은 관심을 받고 있다. 본 연구에서는 *Spirulina platensis* NIES 39의 대량 배양을 위한, 배양온도, 초기 pH, 조도, 탄소와 질소원의 농도 등의 요인에 대한 최적 조건을 확립하고자 하였다. 배양 온도 35 °C에서 초기 pH 9.5, 조도 4500 lux에서 건조 균체중량 2.10 g/L, 클로로필 함량 29.53 mg/L로 가장 우수한 결과를 나타내었으며, 이때의 탄소원과 질소원의 농도는 각각 16.8 g/L NaHCO₃, 2.5 g/L NaNO₃이었다.

Recently, as the interest in the accelerated global warming and the food shortage problem is increased, the concerns for microalgae as photosynthetic microorganisms are also increased. Specially, photosynthetic microalgae, *Spirulina platensis* have been an attractive source for CO₂ gas fixations and for a vast array of valuable nutritious compounds. In this paper, to culture the microalgal *Spirulina platensis* NIES 39 in a batch culture with high mass, optimal conditions for the culture temperature, initial pH, light intensity and concentration of carbon and nitrogen, were tested. At the most favorable culture condition, 35 °C, initial pH 9.5, 4500 lux and carbon and nitrogen concentration of 16.8 g/L NaHCO₃ and 2.5 g/L NaNO₃, the excellent yields of 2.10 g/L biomass and 29.53 mg/L chlorophyll were obtained.

Keywords: microalgae, *Spirulina platensis*, chlorophyll, cultivation of microalgae

1. 서 론

오늘날 전 지구적인 환경문제로 대두되고 있는 지구의 온난화 현상은 지난 100여 년간 사용해 온 화석연료의 연소과정에서 생기는 이산화탄소가 주원인으로 알려져 있다. 축적된 온실가스가 방출되는 적외선을 흡수하여 지구의 기온이 상승하고[1], 빙하가 녹아 해수면이 상승하는 등의 심각한 환경문제를 일으키고 있는 것이다[2]. 현재 전 세계적으로 이러한 문제를 인식하여 많은 대책이 마련되고 있으며, 제도적으로는 UN협약, 교토의정서,巴厘 기후협약 등이 체결되어 탄소 배출에 대한 탄소세 부과를 추진함으로써 각국의 이산화탄소 배출량을 감량하는데 노력을 하고 있다. 또한 배출된 이산화탄소를 감소시키려는 다양한 기술도 시도되고 있다.

온실가스를 처리하는 기술은 크게 흡착법이나 막 분리법과 같이 배기가스 중의 이산화탄소를 분리하는 기술과 이산화탄소를 화학적 또는 생물학적으로 유용물질로 전환하는 고정화 기술로 분류될 수 있다.

이 중, 생물학적인 방법은 태양광을 에너지원으로 하는 광합성반응을 이용하는 것으로 환경 친화적인 방법이라고 할 수 있다[3,4]. 생물학적 이산화탄소 저감 방법은 다시 불모지나 해양에 삼림을 형성하는 방법과[5,6], 미세조류 및 시아노박테리아와 같은 광합성 미생물을 배양함으로써 직접적으로 발전소, 제철소 등의 배기가스를 정화하는 방법으로 나눌 수 있다[3]. 배기가스에는 10~20%에 해당하는 고농도의 이산화탄소가 포함되어 있으며, 이것은 대기 중의 이산화탄소 농도의 500배에 해당하는 농도이다. 이러한 고농도 이산화탄소 환경에서는 광합성의 활성이 저하되기 때문에 이산화탄소 고정화효율 증진, 균주 개발 등 많은 연구가 수행되고 있으며, 이외에도 대량배양[5,6], 유용물질 생산, 성장속도 향상 등의 많은 연구가 국내외에서 수행되고 있다[7,8].

미세조류는 지구 온난화 문제와 대체 식량원의 생산으로 현재 인류가 가지고 있는 문제점을 동시에 해결할 수 있다는 점에서 중요성을 가진다. 미세조류의 배양은 광합성에 필요한 빛과 균체의 항상성을 유지하기 위한 온도가 가장 중요한 요소로 작용한다. 비교적 온화한 기온과 일조량이 풍부한 태국, 중국, 미얀마, 브라질, 하와이 등에서

† 교신저자 (e-mail: jhalee@silla.ac.kr)

Table 1. Composition of SOT Medium for *S. platensis* (Autoclave separately SOT-1 and SOT-2. Add aseptically after medium has stood for 24 h)

	Components	Amount
SOT-1 (Distilled water 600 mL)	NaHCO ₃	16.8 g
	K ₂ HPO ₄	0.5 g
	NaNO ₃	2.5 g
SOT-2 (Distilled water 400 mL)	K ₂ SO ₄	1 g
	NaCl	1 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04 g
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.08 g
	A5 Trace-metals solution	1 mL
A5 Trace-metals solution (Distilled water 1 L)	H ₃ BO ₃	2.86 g
	MnSO ₄ · 7H ₂ O	2.50 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 g
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.21 g
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08 g

육외에서 대량배양을 하고 있으며[9,10], 육외배양의 경우 설치비가 적고 조작하기 쉬운 이점을 가지나, 기온과 일조량의 불안정한 공급 및 오염의 가능성으로 인해 생산성이 낮다는 단점이 있다[11]. 반면에 우리나라와 일본의 경우 연중 기온의 변화가 뚜렷하고, 부지확보에 어려움이 있어 육외배양의 적용이 어렵다. 따라서 우리나라나 일본의 경우 육외배양에 관한 연구보다는 광생물반응기(photobioreactor, PBR) 개발, 유용물질 생산, 균주 개발 및 배양 최적화 등의 연구가 적합하다고 할 수 있다[12-14].

미세조류 중 남조류에 속하는 *Spirulina platensis*는 광합성을 통해 이산화탄소를 고정화 할 수 있으며, 차세대 에너지 및 식량원으로서 주목 받고 있다[11]. *S. platensis*는 완전식품으로 단백질 50~70%, 탄수화물 10~20%, 지질 5~10%, 무기질 7~13%, 비타민 및 섬유질 8~10%를 함유하고 있어, 필수 영양소가 고루 갖춰진 건강 보조 식품으로서 많은 사람들에게 관심을 받고 있다. 또한 광합성 색소인 클로로필 a를 함유하고 있어 식품이나 음료의 천연색소로 이용되며, 의약품의 원료로서도 이용 가능하다[15]. 형태는 0.5 mm 나선형이며, 세포벽은 얇고 부드러운 녹조류에 속하는 *Chlorella* 속에 비해 식용으로 섭취 시 영양성분의 흡수력이 훨씬 우수하다. 또한 강알칼리에 내성을 가지고 있어 폐수처리 등의 환경 분야에 적용할 수 있으며[16-18], 건강보조식품[19,20], 화장품 분야[21], 사료[22,23] 등으로 많이 이용되고 있다.

본 연구는 미세조류 대량배양에 필요한 경제적이면서도 고효율적인 보급형 생물반응기 개발을 위해 필요한 연구로서, 배양에 필수적인 배양인자에 대한 조건을 확립하고자 한다. 따라서 미세조류 배양에 있어 중요한 인자로 생각되는 온도, 초기 pH, 조도, 탄소와 질소원의 농도 등에 따른 성장과 클로로필 함량 변화를 알아보았다.

2. 실험

2.1. 균주 및 배지

본 연구에서는 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받은 *Spirulina platensis* NIES 39 (KCTC AG30033)를 균주로 사용하였다.

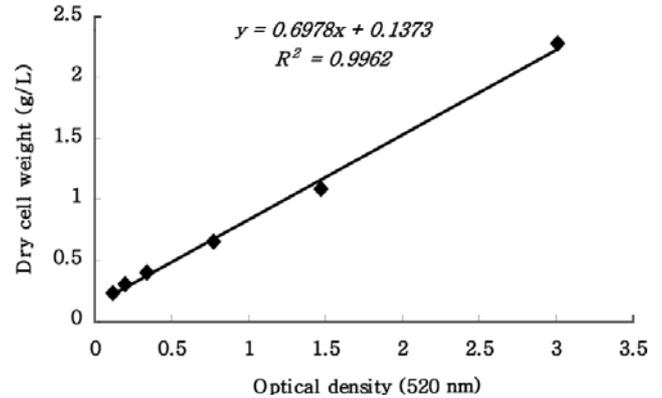


Figure 1. Calibration curve and equations of optical density at A₅₂₀ to Dry cell weight.

배양에 사용된 배지는 알칼리성 무기배지인 SOT medium을 사용하였고[23], 조성은 Table 1에 나타내었다. SOT-1과 SOT-2를 각각 121 °C에서 15 min간 멸균, 냉각 후 혼합하여 사용하였다.

2.2. 배양조건

실험에 사용한 균주는 300 mL flask에 working volume 200 mL, 교반속도 180 rpm, 초기 접종 농도는 0.50 g/L[26]으로 배양하였다. 광주기는 14 : 10 = L : D[24,25]으로, 명반응 시 형광등을 이용하여 조사하였다.

균주의 최적 배양 온도를 확립하기 위해, 25 °C, 30 °C, 35 °C 등으로 온도 조건을 변화하여 12일 동안 배양하였다. 초기 pH는 8.0~11.0까지 0.5 단위로 1 N NaOH, 1 N HCl을 이용하여 조절하였고, pH meter (720P, Istek Inc., Korea)를 사용하였으며, 매 측정 시 보정 후 사용하였다. 조도는 Luxmeter (TES-1332A, TES Electrical Electronic corp., Taiwan)를 이용하여 2500 lux, 4500 lux, 6500 lux, 7500 lux로 조절하여 실험하였다. 또한 탄소(C)원, 질소(N)원의 농도에 따른 그 영향을 알아보기 위하여 각 성분에 대해 SOT medium을 바탕으로 하여 16.8 g/L NaHCO₃, 2.5 g/L NaNO₃을 control로 설정하였고, 0, 1/4, 1/2, 2, 4배의 비율로 농도를 조절하여 35 °C, 180 rpm, 4500 lux에서 12일간 배양하였다. 각 실험은 3번의 반복으로 그 정확성을 확립하였고, 실험군간의 차이는 ANOVA를 이용하여 확인하였다(SPSS ver. 14).

2.3. 균체량 분석

균체량은 UV/Vis spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecacy Ltd., Korea)를 이용하여 520 nm에서 측정한 O.D.값과 건조 균체량(Dry cell weight, DCW)의 상관관계식(Figure 1)을 이용하여 계산하였다. 건조 균체량은 항량된 paper filter를 이용하여 여과된 균체를 105 °C에서 3 h 동안 건조시켜 그 무게를 측정하여 상관관계식을 산출하였다.

2.4. 클로로필 추출 및 분석

*S. platensis*의 클로로필 추출은 P. C. Chen의 방법[27]을 변형하여 사용하였다. 1 mL 균체를 paper filter로 여과한 후 methanol로 추출하였다. 본 연구에 사용된 균주는 원심분리를 하여도 쉽게 가라앉지 않고 균체의 완전한 분리가 어렵기 때문에 여과를 통하여 균체를 분리하였다. 먼저 1 mL의 배양액을 여과하여 여과된 균체를 microtube에 넣고 추출용액 methanol을 1 mL 첨가하였다. 그리고 60 °C, 30 min

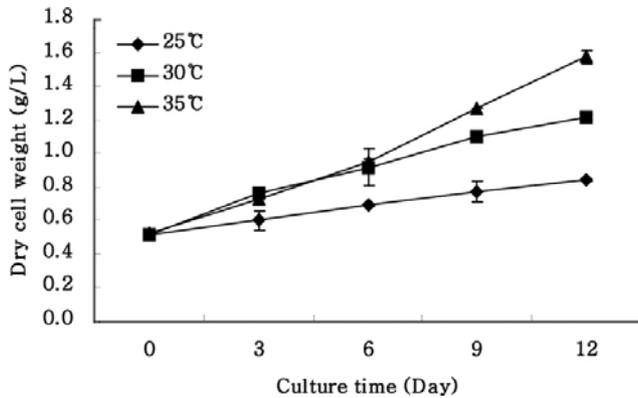


Figure 2. The influence of temperature on the growth of *Spirulina platensis* NIES 39.

동안 추출한 다음, 0 °C, 5 min 동안 냉각시킨 후 650 nm, 665 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 아래의 식을 이용하여 클로로필 함량을 계산하였다.

$$\text{클로로필(mg/L)} = 25.5 \times A_{650} + 4 \times A_{665}[27]$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 온도에 따른 *S. platensis*의 성장

*S. platensis*의 온도에 따른 성장양상을 알아보기 위하여 초기 pH 9.0, 조도 2500 lux, 탄소 및 질소원 농도를 각각 16.8 g/L, 2.5 g/L로 고정하고, 온도 25 °C, 30 °C, 35 °C에서 12일 동안 배양하였으며, 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 25 °C의 경우 배양기간 동안 낮은 성장을 하였으며, 30 °C와 35 °C의 경우 배양 6일째까지 비슷한 성장을 보였으나 이후 35 °C 조건에서 균체의 건조 균체량 1.56 g/L로 가장 높은 성장을 하였다. 이것은 K. H. Ogbonda의 연구[28]에서 *Spirulina sp.*의 최적 배양 온도가 30 °C라는 보고와는 다소 차이가 있으나, D. S. Joo의 연구[13]의 결과와는 일치하였다. 이 결과를 토대로 이후의 실험은 35 °C에서 실시하였다.

3.2. 초기 pH에 따른 성장 변화

초기 pH가 *S. platensis*의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양 온도 35 °C, 조도 2500 lux, 탄소 및 질소원 농도를 각각 16.8 g/L, 2.5 g/L로 고정하고, 초기 pH를 8.0~11.0까지 0.5단위로 변화시켜 12일간 성장양상을 알아보았다(Figure 3). 초기 pH가 큰 영향을 미치는 것 같지는 않으나, 결과적으로 성장은 pH 9.0~10.0에서 가장 우수한 균체 생산량을 보였다. 일반적으로 *S. platensis*의 경우 알칼리에 내성을 지니고 있어 pH 9.0~11.0에서 우수한 성장을 한다고 알려져 있지만, 본 실험의 결과에서는 pH 8.5 이하의 조건과 pH 10.5 이상의 알칼리 조건에서는 급격히 성장이 떨어지는 경향을 보였다. K. H. Ogbonda의 연구[28]에서는 *Spirulina sp.*의 배양에 적합한 초기 pH는 9.0이며, 알칼리성이 더 높아질수록 biomass 생산량은 감소한다고 보고 하였다. 이와 비교하여 같은 속의 미세조류지만 생육하는데 필요한 조건에 약간의 차이가 나타남을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 초기 pH 9.5를 선택하여 실험을 진행하였다.

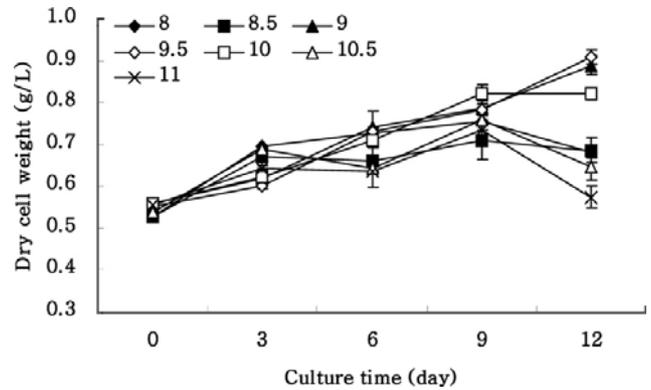


Figure 3. The influence of initial pH on the growth of *Spirulina platensis* NIES 39.

3.3. 조도에 따른 성장 및 클로로필 함량 변화

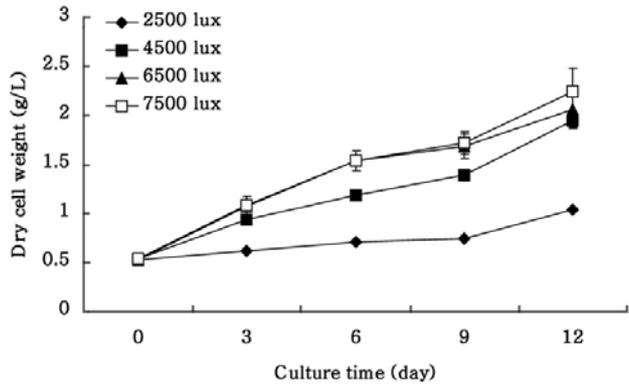
조도에 따른 *S. platensis*의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양 온도 35 °C, 초기 pH 9.0, 탄소 및 질소원 농도를 각각 16.8 g/L, 2.5 g/L로 고정하고, 조도를 2500, 4500, 6500, 7500 lux로 변화하여 12일 동안의 성장 양상을 Figure 4(A)에 나타내었다. 결과적으로 4500~7500 lux에서 우수한 성장을 하였으며, 2500 lux에서 배양한 경우보다 약 3배 정도 높은 결과이다.

또한 조도가 클로로필 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 12일째 최종 클로로필 함량을 측정하여 Figure 4(B)에 나타내었다. 4500 lux의 조건에서 가장 높은 클로로필 함량 29.53 mg/L이 생산되었으며, 이는 2500 lux의 조건에서 클로로필 함량과 비교하여 2배 정도 높은 결과이다. 우수한 성장을 보였던 7500 lux에서의 클로로필 생산량은 4500 lux의 조건에 비해, 25.75 mg/L로 다소 떨어진 결과를 나타내었다. C. Gudin의 연구[29]에서는 지나친 조도는 균체의 성장 및 대사에 악영향을 줄 수 있다고 보고하고 있으며, D. S. Joo[13]의 연구에 의하면, 8400 lux에서 균체의 성장이 저해되나 클로로필 생산량에는 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있다. 본 연구의 결과, 7500 lux에서의 균체성장량은 4500 및 6500 lux와 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 클로로필 생산량에서는 확실한 감소를 나타내었다. 이는 다소 높은 조도인 7500 lux에서 균체 성장은 그다지 큰 영향을 받지 않고 있는 듯하나, 클로로필 생산 등의 대사에는 영향을 받는 것으로 사료된다. 균체 성장과 색소 생산에 대한 과도한 조도의 기준에 대한 연구는 더 진행되어야 할 사항이 될 것이다.

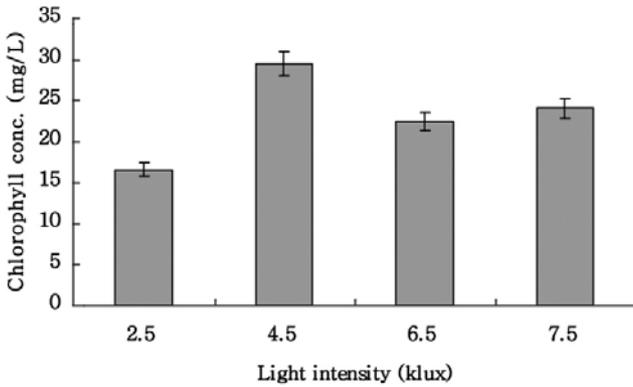
균체 g당 클로로필 생산량은 Figure 4(C)에 나타내었다. 결과는 2500 lux의 조건에서 21.47 mg/g으로 4500 lux와 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 이후 조도가 증가할수록 함량은 저하되는 경향을 나타내었다. 따라서 높은 균체 성장량과 클로로필 생산에 적당한 조도는 4500 lux로 선택하였다.

3.4. 탄소원과 질소원 농도에 따른 영향

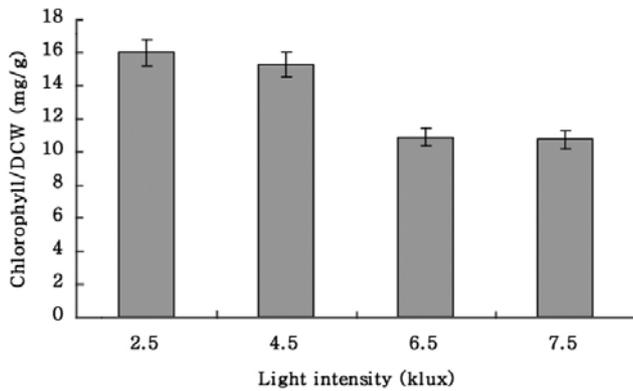
미세조류의 성장에 미치는 또 다른 요인으로 탄소원과 질소원의 농도가 고려되기도 하는데, 이에 따른 영향을 알아보기 위하여 NaHCO₃와 NaNO₃의 농도를 달리하여 12일 동안 균체의 성장양상을 알아보았고 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 앞선 결과를 근거로하여 배양 온도 35 °C, 초기 pH 9.5, 조도 4500 lux에서 실험을 진행하였으며, NaHCO₃와 NaNO₃의 농도는 SOT medium을 기준으로 하여 각각 16.8 g/L, 2.5 g/L를 control로 설정하였고, 각 성분의 농도를 0, 1/4, 1/2, 2,



(a)



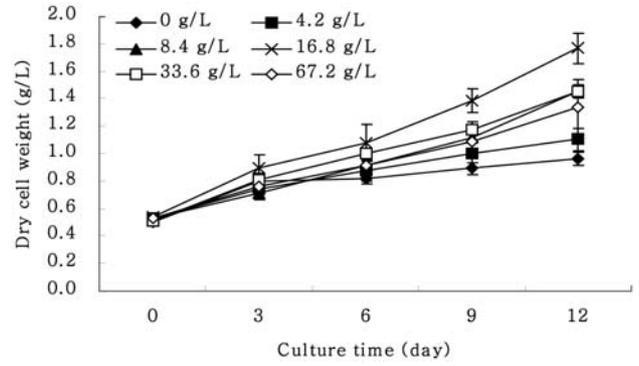
(b)



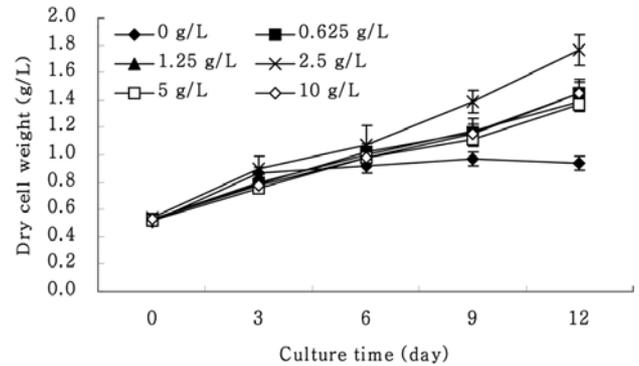
(c)

Figure 4. The influence of light intensity on (a) the growth, (b) chlorophyll concentration and (c) production of chlorophyll per dry cell weight of *Spirulina platensis* NIES 39.

4배로 조절하였다. 탄소원과 질소원의 농도에 따른 영향을 보면 각각의 농도가 각각 16.8 g/L, 2.5 g/L의 조건에서 건조 균체량 1.77 g/L로 가장 우수한 성장을 나타내었으며, 탄소와 질소 성분이 포함 되지 않은 경우 급격히 성장이 저하되는 것을 관찰 하였다. 이 결과를 통해 탄소와 질소 성분이 *S. platensis*의 성장에 중요한 인자로 작용하는 것을 확인 하였다. 본 실험과 관련된 한 특허[30]에서는 16.8 g/L NaHCO₃, 1.214 g/L NaNO₃의 조건에서 가장 우수한 성장을 나타낸다고 보고 하였으며, 본 연구의 결과와는 달리 낮은 질소원에서 우수한 양상을 나타내었다. 이런 결과는 실험 조건 차이에 의한 양상으로 보이며, 특



(a)



(b)

Figure 5. The influence of (a) NaHCO₃ and (b) NaNO₃ concentration on the growth of *Spirulina platensis* NIES 39.

히 광주기(24 : 0 = L : D)가 본 연구의 조건(14 : 10 = L : D)과 큰 차이를 보였고 이로 인하여 균체의 성장에 있어 다른 영향을 미치는 것으로 사료된다.

4. 결 론

*S. platensis*의 대량배양을 위한 효율적인 보급형 광생물반응기를 개발함에 있어서 배양 조건 확립이 필수적이다. 따라서 *S. platensis*의 최적 배양 조건을 알아보기 위하여 배양온도, 초기 pH, 조도, 탄소 및 질소원 농도에 따른 영향을 균체의 성장과 클로로필 함량을 통해 알아 보았으며, 이를 통하여 최적 조건을 선정하였다. 온도의 경우 35 °C에서 우수한 성장을 하였다. 초기 pH의 경우 pH 9.5에서 가장 높은 균체 성장을 하였으며, 10.5이상의 알칼리조건에서는 성장이 급격히 억제되는 경향을 나타내었다. 조도의 경우 성장과 클로로필 생산에 있어서 각각 차이를 보였는데, 4500~7500 lux에서 균체 성장이 매우 우수하였으며, 클로로필 함량의 경우 4500 lux에서 가장 높은 수치를 나타내었다. 탄소원과 질소원 농도에 대한 영향에서는 16.8 g/L NaHCO₃과 2.5 g/L NaNO₃가 적절한 조건임을 알 수 있었다.

감 사

본 과제(결과물)는 지식경제부의 지원으로 수행한 에너지자원인력 양성사업의 연구결과이다.

참고 문헌

1. S. H. Schmeider, *Science*, **243**, 771 (1989).
2. L. Binaghi, A. D. Borghi, A. Lodi, A. Converti, and M. D. Borghi, *Proc. Biochem.*, **38**, 1241 (2003).
3. T. Karube, T. Takeuchi, and D. J. Barnes, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **46**, 63 (1992).
4. D. O. hall and J. I. House, *Energy Convers. Manag.*, **34**, 889 (1993).
5. J. Carlos, R. C. Belen, L. Diego, and N. Xavier, *Aquaculture*, **217**, 179 (2003).
6. J. Carlos, R. C. Belen, and N. Xavier, *Aquaculture*, **221**, 331 (2003).
7. H. M. Oh, J. S. Kim, and S. J. Lee, *Kor. J. of Environ. Biol.*, **16**, 291 (1998).
8. T. H. Kim, K. D. Sung, J. S. Lee, J. Y. Lee, S. J. Oh, and H. Y. Lee, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 235 (1997).
9. A. V. C. Jorge, A. L. Giani, I. P. A. Daniel, M. M. Guilherme, and T. K. Roselini, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 15 (2000).
10. M. Tredici, G. C. Zitelli, S. Biagiolini, and R. Materassi, *Bull. Inst. Oceanogr.*, **12**, 89 (1993).
11. S. M. Jeon, I. H. Kim, J. M. Ha, and J. H. Lee, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **19**, 145 (2008).
12. D. S. Joo, M. G. Cho, R. Buchholz, and E. H. Lee, *J. Korean Fish. Soc.*, **31**, 409 (1998).
13. D. S. Joo, C. K. Jung, C. H. Lee, and S. Y. Cho, *J. Korean Fish. Soc.*, **33**, 475 (2000).
14. Y. S. Kim, H. I. Park, D. k. Kim, and D. W. Park, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 277 (2003).
15. C. O. Rangel-Yagui, E. D. G. Danesi, J. C. M. Carvalho, and S. Sato, *Bioresour. Technol.*, **92**, 133 (2004).
16. R. Rippka, J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman, and P. G. Roughan, *J. Sci. Food Agric.*, **47**, 295 (1989).
17. S. C. Babu and B. Rajasekaran, *Food Policy*, **9**, 405 (1991).
18. E. W. Becker and L. V. Vanattaraman, *Biomass*, **4**, 105 (1984).
19. O. Ciferri, *Microbiol. Rev.*, **47**, 551 (1983).
20. L. M. Mosulishvili, E. I. Kirkesali, A. I. Belokobylsky, A. I. Khizanishvili, M. V. Frontasyeva, S. S. Pavlov, and S. F. Gundorina, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 87 (2002).
21. J. Lu, G. Yoshizaki, K. Sakai, and T. Takeuchi, *Fish. Sci.*, **68**, 51 (2002).
22. A. Vonshak, *Biotechnol. Adv.*, **8**, 709 (1990).
23. T. Ogawa and G. Terui, *J. Ferment. Technol.*, **48**, 361 (1970).
24. F. B. Susana, T. Nishijima, Y. Hata, and K. Fukami, *Nippon Suisan Gakk.*, **57**, 645 (1991).
25. C. Tianfeng, Y. S. Wong, and W. Zheng, *Phytochemistry*, **67**, 2424 (2006).
26. L. H. Pelizer, E. D. G. Danesi, C. O. Rangel, C. E. N. Sassano, J. C. M. Carvalho, S. Sato, and I. O. Moraes, *J. Food Eng.*, **56**, 371 (2003).
27. P. C. Chen, Ph. D. Dissertation, Göttingen Univ., Germany (1979).
28. K. H. Ogbonda, R. E. Aminigo, and G. O. Abu, *Bioresour. Technol.*, **98**, 2207 (2007).
29. C. Gudin and D. Chaumont, *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 481 (1980).
30. Korea Patent 0622025 (2006).