

피부 표면에서의 수분산 바이오셀룰로오스 미세섬유의 특성에 대한 연구

전승현·김서연·박선규·이천구·이설훈*·강내규[†]

(주)LG생활건강 기술연구원,
*동덕여자대학교 응용화학과 화장품과학 전공
(2018년 3월 11일 접수, 2018년 3월 25일 수정, 2018년 3월 26일 채택)

Characterizations of Water-dispersed Biocellulose Nanofibers on the Skin Surface

Seung-Hyun Jun, Seo Yeon Kim, Sun Gyoo Park, Cheon Koo Lee, Seol-Hoon Lee*, and Nae-Gyu Kang[†]

R&D Center, LG Household & Health Care Ltd., 175 Gajeong-ro, Youseong-gu, Daejeon 34114, Korea
*Department of Applied Chemistry (Cosmetic Science Major), Dongduk Women's University, Seoul 02748, Korea
(Received March 11, 2018; Revised March 25, 2018; Accepted March 26, 2018)

요약: 본 연구에서는 바이오셀룰로오스를 산화 촉매인 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidine-N-oxy radical (TEMPO)을 이용해 카복실기로 치환된 수분산 바이오셀룰로오스 미세섬유(TC)를 합성하였다. 합성된 수분산 바이오셀룰로오스는 수용액 및 에멀전에서도 그 구조를 유지하였다. 피부 표면에 미세섬유 구조로 안착된 수분산 바이오셀룰로오스는 바이오셀룰로오스의 고유의 물성인 물리적 강도, 수분 흡수능을 유지하였다. 모델 피부인 젤라틴 겔에 수분산 바이오셀룰로오스를 코팅 후 경도 측정 시, 바이오셀룰로오스 미세섬유가 피부 표면을 잡아주기 때문에 코팅하지 않았을 때에 비해 약 20% 증가하는 것을 확인하였다. 수분 흡수능을 측정하기 위해 돼지피부에 수분산 바이오셀룰로오스를 도포 후 접촉각을 측정하였을 때, 낮은 초기 접촉각을 가지면서도 시간에 따라 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 또한 O/W 제형에서도 수분산 바이오셀룰로오스가 함유된 O/W 제형에서 시간에 따른 접촉각이 감소하는 것을 확인하였다. TC에 대한 연구는 피부 위에서의 미세섬유의 기능에 대한 새로운 인식을 제공할 뿐만 아니라, fiber-cosmetics이라는 새로운 개념의 화장품 제형 연구의 초석이 될 것으로 기대된다.

Abstract: In this study, water-dispersed biocellulose nanofibers (TC) were prepared via an oxidation reaction using 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidine-N-oxy radical (TEMPO) as a catalyst. The TC retained their unique structure in water as well as in emulsion. TC adhered to the skin surface while maintaining nanofibrous structures, providing inherent functions of biocellulose, such as high tensile strength and high water-holding capacity. When gelatin gels as model skin were coated with TC, the hardness representing the elasticity was increased by 20% compared to untreated gelatin gel because TC could tightly hold the gelatin structure. When porcine skin was treated with TC and TC-contained O/W emulsion, the initial water contact angles of TC were lower than other materials, and dramatically decreased over time as water penetrated the fibrous structure of the TC film. Characterization of TC on the skin surface offered insight into the function of nanofibers on the skin, which is important for their applications with respect to fiber-cosmetics.

Keywords: bacterial cellulose, nanofibers, surface modification, water-dispersion, water adsorption

[†] 주 저자 (e-mail: ngkang@lgcare.com)
call: 042)860-8890

1. 서 론

사람의 피부는 외부 환경으로부터 신체를 보호하는 최외각 보호벽이자 약 80%의 물로 구성된 체내의 수분손실을 막아주는 필수적인 역할을 한다. 화장품에서 사용되는 천연 고분자, 합성 고분자 및 유기 고분자는 제형의 점도를 조절하고 피부에 수분을 전달하며 제형 및 유효성분의 안정성 향상을 증가시키는 역할을 할 뿐만 아니라, 피부 표면에 덮여 피막을 형성해 외부로부터 피부를 보호하는 역할을 한다.

특히 셀룰로오스, 키토산, 다당류 폴리머와 같은 천연 고분자(natural polymer)는 생체적합성, 생분해성 성질을 가진 피부 친화적 물질로 알려져 있다. 그중에서도 셀룰로오스는 지구상에서 가장 풍부한 바이오 고분자일 뿐만 아니라 나무, 식물, 미생물 등의 종류에 따라 고유한 물성이 다르기 때문에 다양한 용도로 사용할 수 있다. 일반적으로 화장품에 사용되는 셀룰로오스는 셀룰로오스 마이크로 입자, 셀룰로오스 유도체, 박테리아 셀룰로오스가 있다[1]. 수십 마이크로미터 크기를 갖는 셀룰로오스 마이크로 입자는 물에 녹지 않고 분산성이 낮기 때문에 물리적 박리 용도로 사용이 제한된다. 카복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose, CMC)와 하이드록시에틸 셀룰로오스(hydroxyethyl cellulose, HEC)로 대표되는 셀룰로오스 유도체는 셀룰로오스의 알코올기를 물에 용해될 수 있는 다른 그룹으로 화학적 치환을 통해 얻을 수 있다. 이러한 셀룰로오스 유도체는 물리적 구조를 갖지 않는 고분자 형태로 일반적으로 점증제나 첨가제, 피막형성제로 사용된다.

화장품에 사용되는 또 다른 형태인 박테리아 셀룰로오스(bacterial cellulose, BC)는 *Acetobacter xylinum* (*A. xylinum*) 등의 미생물로부터 직접 합성되는 바이오폴리머로, 화장품에서는 바이오셀룰로오스로 불린다. 바이오셀룰로오스는 식물유래 셀룰로오스에 비해 섬유질의 높은 물리적 강도, 수분 흡수 및 유지 능력, 균일한 섬유 네트워크 형성 등의 다양한 장점을 가진다[2-5]. 이러한 장점으로 인해 3세대 마스크 시트로 주목받고 있으나 젤이나 시트 형태로만 합성되기 때문에 화장품 제형 적용에 어려운 단점이 있다.

2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidine-N-oxyl radical (TEMPO)는 상온, 상압의 온화한 조건에서 셀룰로오스의 알코

올기를 알데하이드, 케톤, 카복시기로 치환할 수 있는 산화 촉매로, TEMPO 처리된 셀룰로오스는 물리적인 섬유 구조를 유지하면서도 물에 분산될 수 있는 장점이 있기 때문에 제지, 멤브레인 필터, 중금속 제거, 세포 전달 등의 다양한 분야에서 연구되고 있다[6-9]. 본 연구에서는 우수한 물성을 가진 바이오셀룰로오스를 TEMPO를 이용해 산화 반응시켜 수분산이 가능한 바이오셀룰로오스 미세섬유(TEMPO 셀룰로오스, TC)를 합성하고, 이를 피부 표면에 적용했을 때, 박테리아 셀룰로오스가 가진 장점인 수분 흡수 능력과 미세섬유 구조체가 피부 표면에 안착되면서 갖는 물리적 특성을 평가하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

바이오셀룰로오스 원단은 EZ Costec Co. Ltd. (Gyeonggi, Korea)에서 구매하였고, TEMPO, sodium bromide, sodium hypochlorite, fluorescein isothiocyanate (FITC), Nile red, poly (lactic acid) (PLA), polyvinyl alcohol (PVA), gelatin 등은 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 에탄올은 Daejung Chemical & Metal Co. Ltd. (Gyeonggi, Korea)에서 구입하였다. 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다.

2.2. 바이오셀룰로오스의 산화반응

바이오셀룰로오스의 화학적 처리를 위해 바이오셀룰로오스와 sodium hypochlorite 및 TEMPO 촉매를 사용하였다[10,11]. 100 g 증류수에 10 mg TEMPO 촉매를 녹인 후, 5 g 바이오셀룰로오스 시트를 넣고 8 g sodium hypochlorite를 넣은 후 상온에서 교반한다. TEMPO 산화반응은 pH 10에서 반응속도가 최적화되나 반응이 진행됨에 따라 pH가 감소하기 때문에 주기적으로 0.5 M NaOH를 이용해 적정하면서 pH를 10 이상으로 유지하면서 12-24 h 교반하여, 바이오셀룰로오스 시트가 물에 분산된 미세섬유 형태로 합성하였다. 제조된 수분산 바이오셀룰로오스 미세섬유를 에탄올을 이용해 반응을 종료시킨 후, 원심분리를 이용해 상온에서 10,000 × g로 수차례 원심 분리하여 정제된 후 상온에 보관하였다.

Table 1. Composition of O/W Emulsion Containing TC

Materials	wt%
Silicon oil	1.00
Ester oil	3.00
Petrocarbon oil	1.00
Humectant	15.50
Emulsifier	0.40
Xanthan gum	4.00
Carbomer	12.00
Preservative	1.50
Chelating agent	0.40
Trisodium EDTA	2.00
pH adjusting agent	2.00
TC	0, 0.015, 0.03
DI water	Up to 100

2.3. TC의 물성 분석

수분산 바이오셀룰로오스 미세섬유(이하, TC)의 특성 분석은 분산성, 카복시 양, 표면전하, 구조 분석을 통해 진행되었다. TC의 분산성을 확인하기 위해, 0.05 wt% TC 용액과 바이오셀룰로오스 시트를 물에 분산시킨 후, 시간에 따른 침전 정도를 확인하였다. 바이오셀룰로오스 시트(original BC)는 그 자체로는 물에 분산되지 않기 때문에, 고속분쇄기(HR2195, Shenzhen, Co. Ltd., China)를 이용해 물리적으로 파쇄한 후 침전 정도를 확인하였다. 카복시 양 측정은 0.01 wt% TC 용액을 전기전도도 측정 방법을 통해 측정하였고, 표면 전하는 같은 샘플을 제타전위 측정기기(System Zeta Potential, Metek Co., Germany)를 이용해 측정하였으며, 물리적 구조 분석은 0.03 wt%의 TC 용액 및 O/W 제형 샘플을 20 mA으로 120 s간 플래티늄 코팅을 진행한 후, 전계방출 주사전자현미경(SEM; Hitachi S-4000, Japan)을 이용하여 관찰하였다. TC를 함유한 O/W 유화 에센스는 다음과 같은 방법으로 제조하였다(Table 1). 정제수에 TC를 계량하여 충분히 교반시킨 다음 디스퍼서를 이용하여 1,500 rpm으로 30 min 이상 균일하게 분산시켰다. 이후 점증제인 가보머 및 잔탄검, 보습제, 킬레이팅제, 함염제, pH 조절제 방부제를 첨가하여 60 °C로 가열하고, 미리 계량하여 60 °C로 가열하여 둔 오일 및 유화제와 혼합하여 호모믹서로 4,500 rpm, 10 min간 혼합하였다. 이후 탈포, 여과, 냉각시켜 제형을

완성하였다.

2.4. TC의 피부 표면에서의 특성 분석

TC의 피부 표면에서의 특성 분석은 경도, 표면 흡윤성을 측정하였다. 경도시험은 탄력 측면에서 TC의 효과를 확인하기 위해 수행되었으며 만능시험기(texture analyzer, TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK)를 이용해 진행되었다. 4 mL의 5 wt% 젤라틴 겔을 준비한 후, 0.03 wt% TC 용액을 도포하고 건조시켰다. 경도시험 시 만능시험기의 조건은 다음과 같다; pre-test speed: 1 mm/s, test speed: 0.4 mm/s, hold time: 10 s, post-test speed: 1 mm/s, 5 g trigger force.

셀룰로오스 종류에 따른 표면 흡윤성은 접촉각 측정기기(Contact Angle System OCA, Dataphysics CO., Germany)를 이용한 접촉각 측정을 통해 진행되었다. 2 × 2 cm의 돼지피부에 0.1 wt% 셀룰로오스 용액을 도포 및 건조시킨 후, 10 μL 물을 떨어뜨린 후 초기 접촉각 및 시간에 따른 접촉각을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. TC의 특성 분석

바이오셀룰로오스 시트를 산화제인 sodium hypochlorite와 산화촉매인 TEMPO를 투입한 후, 상온에서 pH 10 이상으로 유지하면서 교반시키면 산화반응에 의해 셀룰로오스 C6의 알코올기가 카복시기로 치환된다(Figure 1 A)[10,11]. 치환된 바이오셀룰로오스는 수용액상에서 뛰어난 분산력을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 기존 바이오셀룰로오스 시트의 경우, 물리적으로 분쇄할 경우 수 시간 내에 침전이 발생하나, TC의 경우 10일 이후에도 분산성이 유지되었으며, 이후 약 한달 이후에도 수용액 상에서 분산이 유지되는 것을 확인하였다(Figure 1 B).

TC의 치환도를 확인하기 위해 카복시기의 양을 측정하였을 때, 카복시기 양은 1.08 mmol · g⁻¹로, 기존 바이오셀룰로오스 시트(0.02 mmol · g⁻¹)에 비해 카복시기가 크게 증가였으며, 이전에 보고되었던 나무 유래 셀룰로오스를 산화하였을 때의 카복시기 양과 큰 차이를 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다.

합성된 TC 및 TC가 함유된 O/W 제형에서 음전하를

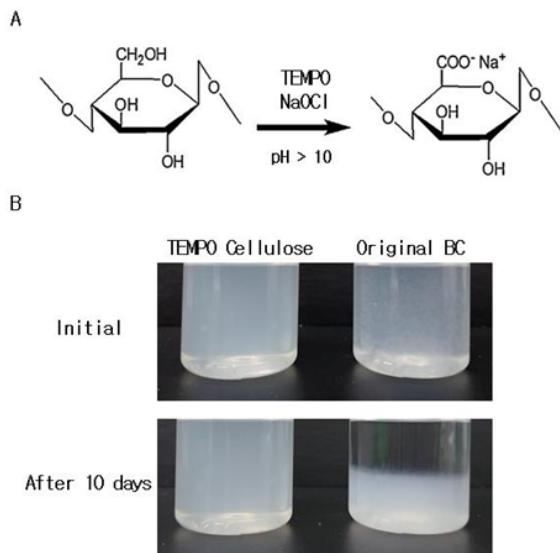


Figure 1. (A) Schematic diagram of the TEMPO-oxidation of BC. (B) Dispersion states of the TC and original BC with increased time.

갖는지 확인하기 위해 제타전위를 측정된 결과, TC 및 0.03 wt% TC가 함유된 O/W 제형은 각각 -77.5 , -70.7 mV로 측정되었고, 기존 O/W 제형은 -7.1 mV로 측정되었다(Table 2). 이를 통해 합성된 TC는 셀룰로오스의 알코올기가 카복시기로 성공적으로 치환된 것을 알 수 있었다.

일반적으로 화장품에 사용되는 HEC나 CMC의 경우, 제형의 점성을 증가시키는 점증제로 사용되고 있다. 미세섬유 구조를 가진 TC의 점증 기능을 확인하기 위해 TC 농도(0, 0.015, 0.03 wt%)에 따른 O/W 제형을 제조한 후, 점도계를 이용해 점도를 측정하였다. 그 결과, 0, 0.015, 0.03 wt% TC 함유 O/W 제형의 점도는 각각 2,200, 4,700, 7,200 mPa·s로 측정되었다. 이는 TC가 미세섬유의 구조를 유지하면서도 기존 셀룰로오스가 갖고 있는 점증력을 함께 보임을 확인한 것이다.

3.2. 피부 표면에서의 TC의 피부 부착성

합성된 TC가 피부에 도포 시 피부에 부착되어 있는지를 확인하기 위해 돼지피부(2×2 cm)에 0.03 wt% TC 용액을 도포 및 건조시킨 후 SEM으로 확인하였다. Figure 2에서 볼 수 있듯이, TC의 직경은 30-60 nm이고, 길이는 바이오셀룰로오스의 길이와 차이가 없는 것으로 확인되었다. 또한 돼지피부 표면에 TC가 네트워크를

Table 2. Zeta Potential of TC and O/W Emulsion with and without TC

	Zeta potential
TC	-77.5 mV
O/W emulsion (with TC)	-70.7 mV
O/W emulsion (without TC)	-7.1 mV

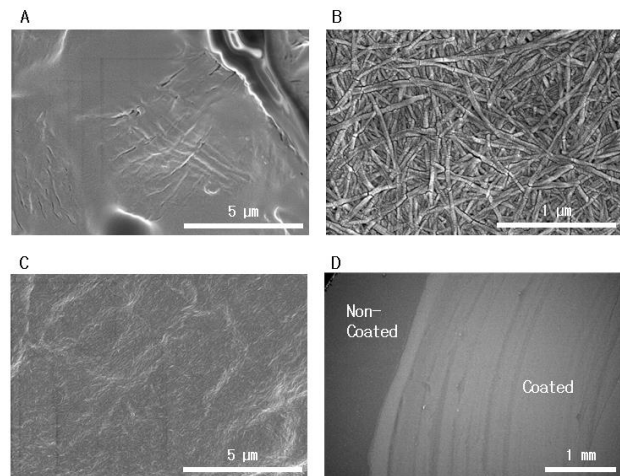


Figure 2. SEM images of (A) bare porcine skin and (B, C, D) zoom-in and zoom-out images of TC on the porcine skin.

네트워크를 형성하면서 안정적으로 도포되어 있는 것을 확인하였으며, 줌-아웃 이미지 분석을 통해 미세섬유 네트워크 형태의 TC가 줌-아웃 이미지 상에서도 돼지피부를 커버하고 있으며, 도포한 부위와 무도포 부위가 명확히 구분되는 것을 볼 수 있었다(Figure 2 B, C, D). 이는 TC가 피부 표면에 미세섬유를 형성하여 부착되어 있다고 볼 수 있다. 피부에 부착된 TC의 특성을 확인하기 위해, 0.015 wt% TC 용액을 피부에 도포하고 30분 후 마찰력측정기(fractiometer, FR700)를 이용해 피부마찰력을 측정하였다. 사람마다 값의 편차가 크기 때문에 초기 값을 100으로 놓고 도포 후의 마찰력 감소를 상대적으로 확인하였다. 그 결과, 도포 전에 비해 피부마찰력이 약 9.8% 감소한 것을 확인하였다. 이는 피부에 잔류해있는 미세섬유 네트워크가 피부를 밀었을 때의 마찰력을 감소시켜 피부 표면을 부드럽게 해준다고 볼 수 있다.

3.3. 피부 표면에서의 TC의 경도 특성

피부에 부착된 TC의 특성을 확인하기 위해, 5 wt%

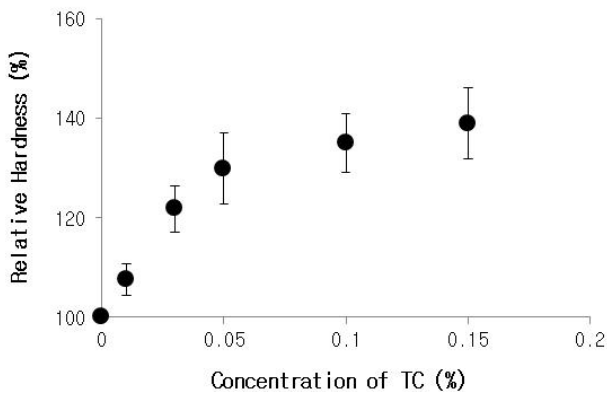


Figure 3. Relative hardness of TC deposited on the gelatin gel as a function of TC concentration.

젤라틴 겔에 TC 용액을 농도별로 도포 및 건조시킨 후 만능시험기를 이용해 경도를 측정하였다. 만능시험기에 의한 경도 커브는 시간에 따른 가해진 힘으로 결정되는데, 이때 경도는 프로브가 시료를 압축하는데 필요한 최대 힘(maximum force)으로 정의된다. 만능물성 분석기에 젤라틴 겔의 면적보다 작은 크기의 시편을 장착하고 시편이 TC가 도포된 젤라틴 겔을 일정한 속도로 내려가면서 누르게 되면 압력이 증가하는데, 누르는 압력이 커진다는 것은 표면 구조의 경도가 증가하는 것을 의미하며, 이는 표면의 탄력이 증가한다고 볼 수 있다. 경도시험 결과, 젤라틴 겔에 코팅한 TC의 농도가 증가할수록 경도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 셀룰로오스 미세섬유가 젤라틴 표면에 네트워크를 형성하면서 젤라틴 표면 구조를 잡고 있기 때문에 젤라틴 겔의 탄력이 증가한 것으로 볼 수 있다.

3.4. 피부 표면에서의 TC의 수분흡수능

바이오텔룰로오스는 다른 셀룰로오스와 비교할 때, 높은 수분 흡수 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[12,13]. 합성된 TC가 바이오텔룰로오스의 장점인 수분 흡수력을 유지하고 있는지 확인하기 위해, 돼지 피부에 다양한 셀룰로오스 샘플을 도포 및 건조시킨 후 물을 떨어뜨려 초기 접촉각 및 시간에 따른 접촉각 변화를 확인하였다(Figure 4). 기존 화장품에서 사용되는 셀룰로오스인 HEC와 CMC의 초기 접촉각은 각각 76.5, 64.1°로 측정되었으며, 시간에 따른 접촉각의 감소도 크게 나타나지 않았다. 반면, TC의 경우 초기 접촉각은 26.5°로 측정되었으며, 시간에 따라 접촉각이

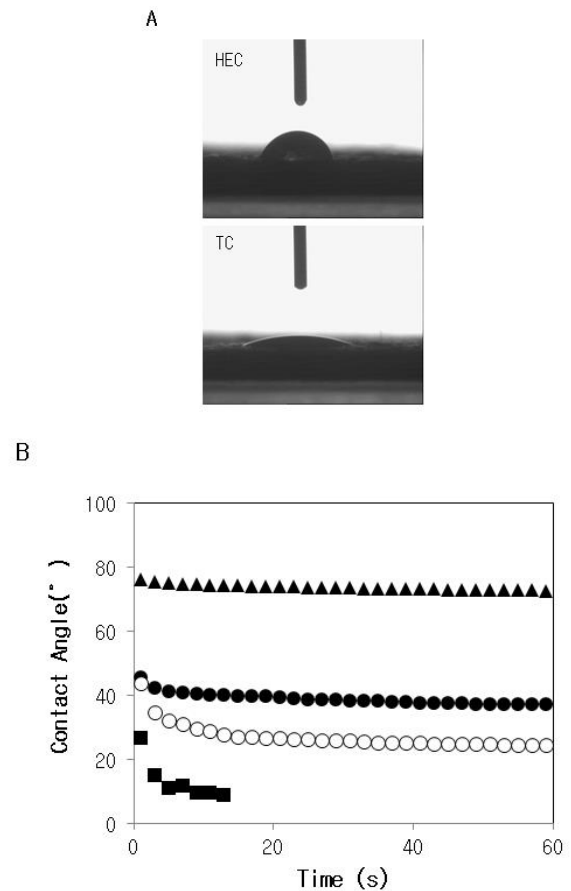


Figure 4. Contact angle measurement of different types of celluloses covering the porcine skin. (A) Microscopic images of water droplet on various celluloses covering the porcine skin at the initial stage. (B) The change in the contact angle with time (▲: HEC, ●: O/W emulsion without TC, ○: O/W emulsion with TC, ■: TC).

급격하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 미세 섬유 네트워크가 물을 빠르게 잡아당기기 때문으로 해석할 수 있다. TC가 함유된 O/W 제형에서도 이러한 효과가 나타나는지 확인해보기 위해 일반 O/W 제형 및 0.05 wt% TC가 함유된 O/W 제형의 접촉각을 비교해보았을 때, 초기 접촉각은 유사한 경향을 보였으나, 시간에 따른 접촉각은 TC가 함유된 O/W 제형에서만 크게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이를 통해 TC는 바이오텔룰로오스의 수분 흡수 능력을 유지하는 것으로 볼 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 바이오셀룰로오스를 TEMPO 산화반응을 통해 카복시기로 치환된 수분산 바이오셀룰로오스 미세섬유를 합성하고, 피부 표면에서의 피부 안착성, 탄력, 수분흡수능 등의 특성을 확인하였다. TC는 식물유래 셀룰로오스에 비교할 때 뛰어난 물성을 가지고 있으나 시트형태로만 합성되어 사용에 제한을 가지는 바이오셀룰로오스를 수분산 시킴으로써 기존의 고유한 장점을 유지하면서도 제형에 사용이 가능하기 때문에 피부 표면에서 탄력 증가, 수분 흡수 촉진 등의 추가 기능을 가질 뿐만 아니라, 미세섬유 형태의 물리적 구조가 미세먼지 등의 유해물질 차단과 같은 새로운 기능을 할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 앞으로 유해물질 차단 기능과 관련한 메커니즘 규명 및 추가적인 연구를 진행할 예정이다.

Reference

1. D. Klemm, B. Heublein, H. Fink, and A. Bohn, Polymer science cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 3358 (2005).
2. A. Svensson, E. Nicklasson, T. Harrah, B. Panilaitis, D. L. Kaplan, M. Brittberg, and P. Gatenholm, Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, *Biomaterials*, **26**, 419 (2005).
3. N. Tahara, M. Tabuchi, K. Watanabe, H. Yano, Y. Morinaga, and F. Yoshinaga, Degree of polymerization of cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 decreased by cellulase produced by the strain, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1862 (1997).
4. T. Naritomi, T. Kouda, H. Yano, and F. Yoshinaga, Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture, *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 89 (1998).
5. J. Lee, F. Deng, W. G. Yeomans, A. L. Allen, R. A. Gross, and D. A. Kaplan, Direct incorporation of glucosamine and N-acetylglucosamine into exopolymers by *Gluconacetobacter xylinus* (5 *Acetobacter xylinum*) ATCC 10245: production of chitosan-cellulose and chitin-cellulose exopolymers, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3970 (2001).
6. J. Shah and R. M. Brown, Towards electronic paper displays made from microbial cellulose, *Appl. Microbiol. Biot.*, **66**, 352 (2005).
7. Q. Tarres, H. Oliver-Ortega, M. Llop, M. A. Pelach, M. Delgado-Aguilar, and P. Mutje, Effective and simple methodology to produce nanocellulose-based aerogels for selective oil removal, *Cellulose*, **23**, 3077 (2016).
8. R. A. de Carvalho, G. Veronese, A. J. F. Carvalho, E. Barbu, A. C. Amaral, and E. Trovatti, The potential of TEMPO-oxidized nanofibrillar cellulose beads for cell delivery applications, *Cellulose*, **23**, 3399 (2016).
9. Q. Tarres, M. Delgado-Aguilar, M. A. Pelach, I. Gonzalez, S. Boufi, and P. Mutje, Remarkable increase of paper strength by combining enzymatic cellulose nanofibers in bulk and TEMPO-oxidized nanofibers as coating, *Cellulose*, **23**, 3939 (2016).
10. T. Saito, Y. Nishiyama, J. L. Putaux, M. Vignon, and A. Isogai, Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose, *Biomacromolecules*, **7**, 1687 (2006).
11. T. Saito, S. Kimura, Y. Nishiyama, and A. Isogai, Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose, *Biomacromolecules*, **8**, 2485 (2007).
12. L. Fu, J. Zhang, and G. Yang, Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair, *Carbohydr. Polym.*, **92**, 1432 (2013).
13. J. D. Fontana, A. M. De Souza, C. K. Fontana, I. L. Torriani, J. C. Moreschi, B. J. Gallotti, S. J. De Souza, G. P. Narcisco, J. A. Bichara, and L. F. X. Farah, *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24-25**, 253 (1990).