

해양세균 *Zoogloea* sp.로부터 두 종류의 polysaccharide 생산조건

*장명웅·강양순·**홍종욱·***김종덕·†공재열
부산수산대학교 생물공학과, *고신대학교 의과대학 미생물학교실
부산수산대학교 미생물학과, *여수수산대학교 생물공학과

Production Conditions of Two Polysaccharides from Marine Bacterium *Zoogloea* sp.

Myung-Woong Chang*, Yang-Soon Kang, Jong-Wook Hong,**
Jong-Deog Kim*** and Jai-Yul Kong†

Dept. of Biotechnology & Bioengineering, National Fisheries University of Pusan

*Dept. of Microbiology, Medical school, Kosin University

**Dept. of Microbiology, National Fisheries University of Pusan

*** Dept. of Biological Engineering, Yosu National Fisheries University

ABSTRACT

Marine bacterium, as a microbial source producing polysaccharides, was newly isolated from the eastern and western sea of Korea and was identified as *Zoogloea* sp. (KCCM 10036). It produced two different types of polysaccharides, especially : WSP (water-soluble polysaccharide) and CBP (cell-bound polysaccharide). The former was isolated from the supernatant of centrifuged broth by acetone precipitation, and the latter was isolated from the pellet by acetone and CPC (cetylpyridinium chloride) precipitation. The productivities of polysaccharides were increased with the addition of promoting agents such as biotin, ampicillin and surfactant. After batch fermenting, the productivities of WSP and CBP were reached to maximum values of 9.0g/ℓ, 2.5g/ℓ in the culture medium containing 1% of glucose as a carbon source.

서론

Biopolymer는 생분해성, 다기능성, 구조의 다양성 그리고 발효생산시 재생가능 기질 사용 등의 장점을 가지고 있어 다양한 이용성이 예상되므로 구미, 일본, 우리 나라 등지에서 미생물에 의한 생산연구가 활발하다.

Polysaccharide는 monosaccharide의 중합체로서

식물과 bacteria 등의 세포벽을 이루는 구성물질이며(1), 식물과 동물의 체내에서 starch와 glycogen과 같은 형태로 에너지 저장역할을 하는 물질이기도 하다(2). 또한 polysaccharide는 다른 단백질이나 지질과 결합하여 glycoprotein과 glycolipid를 형성하여 세포표면에서 receptor로도 작용하기도 하는데, 이와 같은 생화학적 작용 및 물리학적 특성은 많은 분야에의 응용이 기대되고 있다.

특히, 미생물유래의 biopolymer는 intracellular, cell wall 및 extracellular 형태로 나뉘어지며, 그

† Corresponding Author

중에서도 1925년 파스퇴르연구소에서 세포로부터 처음 추출한 PHB(poly- β -hydroxybutyric acid)는 intracellular biopolymer로서, 영양물질 등이 제한되었을 때 세포내의 탄소원 및 에너지 저장물질로 축적되고(3), 환경오염을 일으키지 않는 생분해 thermoplastic polyester로서 여러 가지 용도에서 각광받고 있다(4). Cell wall biopolymer로서는 lipopolysaccharide나 β -glucan 등을 들 수 있으며, extracellular biopolymer로 알려져 있는 extracellular polysaccharide는 세포의 외부에 slime이나 capsule을 형성하며, 비교적 회수가 간단하고 정제에 비용이 적게 들 뿐만 아니라(5), 독특한 물리적, 화학적 특성 및 유변특성으로 말미암아 흡착제, 유화제, 안정제, 접착제, 윤활제 등의 용도로 식품, 의학 및 화학공업 분야에서 폭 넓은 이용성을 지니고 있다(6).

이와 같이 다양한 기능을 가진 미생물 유래 polysaccharide를 생산하는 균주로서는 *Zoogloea ramigera*가 생산하는 고분자 물질이 높은 점도와 분자량을 가지며, pH, 열, 기계적인 전단응력에 대하여 매우 안정한 것으로 보고되어 있다(7, 8).

그러나 지금까지 *Zoogloea* sp.는 일반적으로 한 종류의 polysaccharide를 생산하는 것으로 알려져 있는데 반하여 본 연구에 사용된 *Zoogloea* sp.(KCCM 10036)는 해수로부터 분리되어, 지금까지 보고된 *Zoogloea* sp.와는 달리 서로 다른 두 가지 종류의 polysaccharide, 즉 water-soluble polysaccharide(WSP)와 cell-bound polysaccharide(CBP)를 생산한다(9-11). 이들 polysaccharide는 각각 서로 다른 glucose, galactose, mannose의 구성비를 지니며(WSP, 2:2:3; CBP, 1:1:2), 당성분비의 약 50%는 uronic acid로 구성되어 있음이 확인되었다(12). 또한, 이들 두 종류의 polysaccharide는 모두 중금속 흡착능(13)과 antitumor activity를 가지고 있으며(14), 그 중에서도 cell-bound polysaccharide는 고정화 효소의 지지체로서의 이용가능성을 가지고 있는 등 이들의 다양한 이용이 기대되고 있다(15).

따라서 본 연구에서는 polysaccharide를 생산하는 해양성 *Zoogloea* sp.(KCCM 10036)의 세균학적 특성을 조사함과 동시에 이 균주가 생산하는 polysaccharide의 산업적 이용을 목적으로 생산촉진인자를 사용하여 생산성향상에 관하여 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 보존

본 연구에 사용된 균주는 우리 나라의 동해와 서해안의 해수시료에서 변형해수고체배지로 순수분리하였고, 분리 균주는 2주마다 변형해수고체배지에 계대배양하여 4°C에 보관하였다.

균학적 특성조사

형태적 관찰은 광학현미경(Carl Zeiss Jenane-2, $\times 1000$ 배)에서 행하였고, 생화학적 검사는 rapid multi-system, API 20E and 20NE(Alytab product Inc., France)를 이용하였고, 균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology에 의해 행하였다(16).

배지 및 배양방법

균주의 분리 및 배양조건을 조사하기 위한 기본 배지는 glucose 10g/l, peptone 5g/l, NH_4NO_3 0.0016g/l, Na_2HPO_4 0.008g/l, NaCl 23.4g/l, KCl 0.7g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.6g/l, CaCl_2 1.1g/l, Na_2SO_4 3.9g/l, NaHCO_3 0.2g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g/l, K_2HPO_4 0.01g/l, Tris(hydroxymethyl)aminomethane 6.05g/l의 조성을 지니며, pH는 7.8로 조절하여 사용하였다(17). 단, glucose의 농도를 달리 한 실험에서는 필요에 따라 농도를 조절하여 사용하였고, glucose외의 기질을 사용한 실험에는 glucose 대신 해당기질을 적절히 첨가하여 사용하였다. 또한 고체배지에는 agar(1.5%, w/v)를 첨가하였다. 소규모 회분배양은 500ml baffled flask에 기본배지 100ml를 넣고 30°C로 조절된 shaking incubator에서 200rpm의 회전속도로 5일간 행하였다. Fermentor(5 l jar fermentor, KFC Co., Korea)를 이용한 회분배양에서는 역시 기본 배지를 이용하였고, working volume은 2.5 l, 배양온도는 30°C, 통기량 2vvm, 교반속도 200~1,200rpm 범위의 회전 조건에서 배양하였다. Fermentor 접종을 위한 seed culture는 30°C의 shaking incubator에서 200rpm으로 12시간 동안 flask에서 배양하여 2%가 되게 하였다.

균체량 측정 및 Polysaccharide의 정량

배양에 의해 얻어진 crude polysaccharide의 분리는 Fig. 1과 같이 배양액 30ml에 동량의 증류수를 첨가하여 잘 혼합한 뒤, 33,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 water-soluble polysaccharide(WSP)와 cell-bound polysaccharide(CBP)를 분리하였다. WSP는 상등액에 2배의 acetone을 첨가하여 침전된 것을 acetone:water = 1:1의 용액으로 여러번

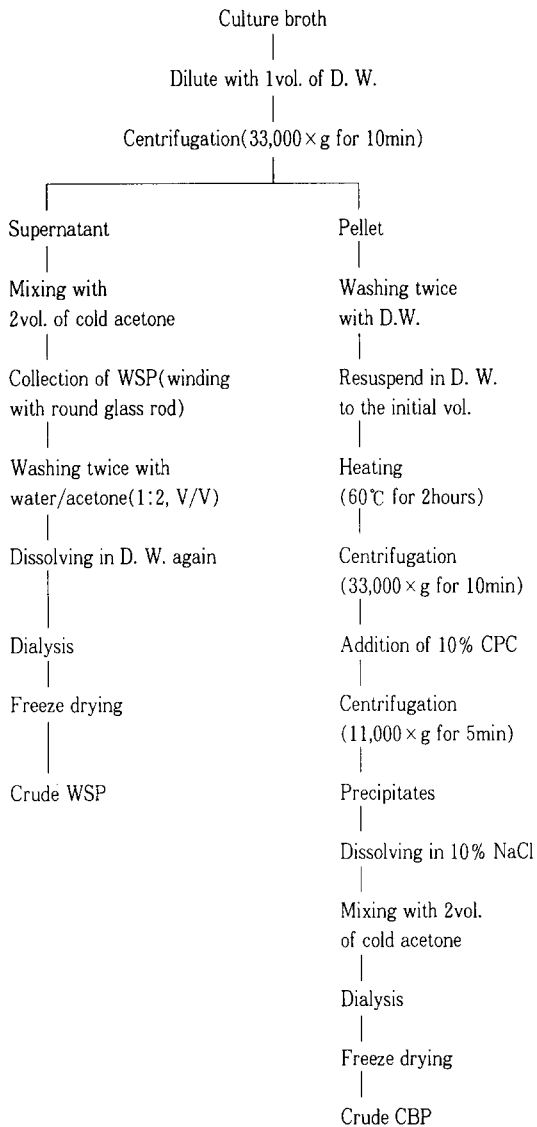


Fig. 1. Isolation steps of crude polysaccharides (WSP and CBP) from culture broth.

세정하고 미리 무게를 달아 둔 호일 컵에 넣어 80°C dry oven에서 충분히 건조시킨 다음, 중량을 측정하였다. CBP는 원심분리 후의 cell 침전물에 처음 부피와 같게 되도록 증류수를 넣어 재현탁한 뒤 60°C에서 24시간 동안 교반처리하여 이를 33,000×g에서 10분간 다시 원심분리한 후, 상등액에 cetylpyridinium chloride(CPC)을 10% (w/v)가 되게 넣어 polysaccharide 부분을 분리하였다. 이를 10%

의 sodium chloride 용액 1ℓ에 녹여 CPC와 CBP를 분리시킨 후 2배의 acetone을 첨가하여 CBP를 분리하였으며, pellet은 증류수로 세척하여 다시 원심분리한 후 cell만을 모았다. Cell과 CBP의 중량은 WSP와 동일한 방법으로 건조중량을 측정하였다.

잔존 기질량의 정량

배양액 중의 잔존 기질량을 정량하기 위해서 원심 분리된 상등액을 1ml 취하여 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 법으로 반응시켜서 550nm에서 흡광도를 측정하고, 이를 standard curve와 비교하여 정량하였다(18).

Viscosity의 측정

Polysaccharide의 점도는 회전점도계(Brookfield LVTDV-II, spindle SC4-18)를 사용하여 20°C, 0.6rpm에서 전단을 가한 후 점도가 일시적인 평형을 유지할 때의 겔보기 점도로 측정하였다.

Gel Chromatography

동결건조한 두 종류의 crude polysaccharide는 pore size가 0.2μm인 membrane을 이용하여 여과한 후, 0.5M NaCl을 넣은 50mM sodium phosphate buffer를 용출액으로 하는 Sepharose CL-4B column(1.7×80cm)을 이용하여 gel filtration을 행하였다.

분리된 물질은 phenol-H₂SO₄법(19)과 Bradford 법(20)에 의해 당과 단백질을 각각 정량하였다.

결과 및 고찰

세포의 균학적 특성

해수로부터 분리한 균은 Bergey's manual of systematic bacteriology에 의해 *Zoogloea* sp.로 동정되었다. 분리된 균은 고체배지상에서 mucooid colony를 형성하였으며 Table 1과 같은 특성검사로부터 Gram(-)으로 밝혀졌고 운동성을 가지고 있었다.

분리된 Polysaccharide의 특성

Fig. 2, 3은 WSP, CBP의 gel chromatography의 결과를 나타낸 것으로 이들 polysaccharide에는 단백질이 부착되어 있으며, CBP가 WSP의 경우보다 높은 단백질함유율을 나타내었다.

최적 탄소원(Flask 배양)

Table 1. General characteristics of *Zoogloea* sp.

| Tests | Results | Tests | Results |
|--------------------------------|----------------|---|---------|
| Gram stain | - ^a | Citrate utilization(CIT) | - |
| Oxidase | + ^b | H ₂ S production(H ₂ S) | - |
| Catalase | + | Urease(URE) | + |
| Motility | + | Tryptophane desaminase(TDA) | - |
| Starch hydrolysis | + | Indol production(IND) | - |
| Skim milk hydrolysis | - | Acetoin production(VP) | - |
| Gelatin liquifization | + | Gelatinase(GEL) | + |
| Ammonification | + | Glucose utilization(GLU) | + |
| Methyl red | - | Mannitol utilization(MAN) | + |
| TCBS agar | - | Inositol utilization(INO) | + |
| MacConkey agar | - | Sorbitol utilization(SOR) | + |
| Pigment formed by colonies | - | Rhamnose utilization(RHA) | + |
| Fluorescent pigment production | - | Sucrose utilization(SAC) | + |
| Floc formation | + | Melibiose utilization(MEL) | + |
| β -galactosidase(ONPG) | - | Amygdalin utilization(AMY) | - |
| Arginine dihydrolase(ADH) | - | Arabinose utilization(ARA) | - |
| Lysine decarboxylase(LDC) | - | NO ₂ production(NO ₂ -NO ₂) | - |
| Ornithine decarboxylase(ODC) | - | | |

^a: negative reaction, ^b: positive reaction

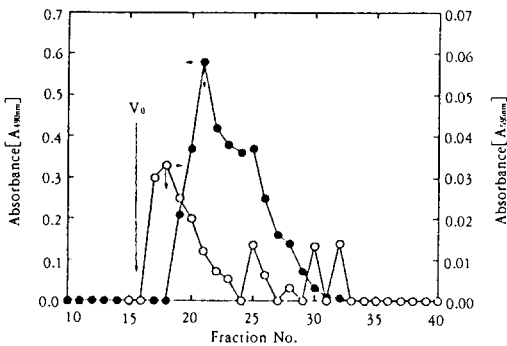


Fig. 2. Gel filtration of WSP on column(1.7×80 cm) of Sepharose CL-4B. The eluent was 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) containing 0.5M NaCl. V₀ represents the void volume of the column(—●— Total sugar, —○— Total protein).

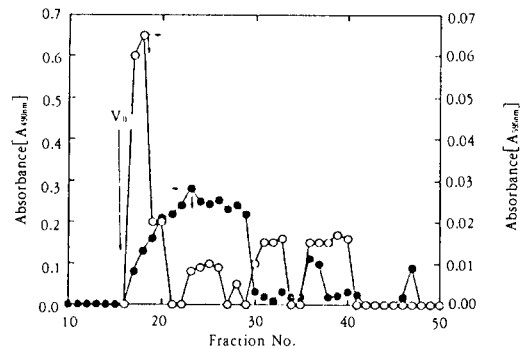


Fig. 3. Gel filtration of CBP on column(1.7×80 cm) of Sepharose CL-4B. The eluent was 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) containing 0.5M NaCl. V₀ represents the void volume of the column(—●— Total sugar, —○— Total protein).

본 실험에 사용된 *Zoogloea* sp.가 생산하는 두 종류의 polysaccharide는 탄소원의 종류에 따라 각 polysaccharide 생산량이 영향을 받는 것으로 나타났다. Water-soluble polysaccharide는 탄소원으로서 fructose를 사용하였을 경우, 최대생산량을 보인

반면, cell-bound polysaccharide는 glucose를 사용하였을 경우에 최대치를 보였다(Table 2).

탄소원의 농도(Flask 배양)

Polysaccharide의 생산량에 미치는 탄소원 농도

Table 2. Effects of carbon sources on cell growth and polysaccharides production.

| Carbon source[1%, w/v] | Dry cell weight[g/ℓ] | Productivity[g/ℓ, dry matter] | |
|------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | | Water-soluble polysaccharide | Cell-bound polysaccharide |
| None | 0.180 | 0.000 | 0.237 |
| Glucose | 0.200 | 3.200 | 1.700 |
| Maltose | 0.390 | 4.340 | 1.440 |
| Fructose | 0.120 | 6.260 | 0.447 |
| Sucrose | 0.157 | 2.120 | 0.343 |
| Lactose | 0.130 | 1.620 | 0.190 |

Table 3. Effects of glucose concentration on cell growth and polysaccharides production.

| Carbon source[1%, w/v] | Dry cell weight[g/ℓ] | Productivity[g/ℓ, dry matter] | |
|------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | | Water-soluble polysaccharide | Cell-bound polysaccharide |
| 0 | 0.180 | 0.00 | 0.237 |
| 1 | 0.200 | 0.20 | 1.700 |
| 2 | 0.253 | 10.57 | 1.451 |
| 3 | 0.341 | 11.98 | 1.310 |
| 5 | 0.321 | 13.85 | 1.310 |
| 7 | 0.373 | 4.01 | 1.240 |

의 영향을 Table 3에 나타내었다. 고정된 질소원(0.5% peptone)을 사용하여 glucose의 농도를 달리 하였을 경우, 탄소원의 농도, 즉 C/N ratio에 비례하여 polysaccharide의 생산이 증가하였다. 또한 glucose의 농도가 5% 이상에서는 오히려 polysaccharide의 생산량이 감소되는 경향을 보여 탄소원의 최적농도 존재가 확인되었으며, 이는 일정농도 이상의 탄소원은 polysaccharide 생산을 저해한다는 다른 보고와도 일치하는 결과를 나타내었다(21). 한편, glucose의 농도증가로 인해 polysaccharide의 생산량은 증가하였으나 CBP 생산량의 증가와는 일치하지 않았다. 본 논문에서는 이용성이 많은 CBP의 유도생산에 중점을 두고, CBP생산에 적합한 1%의 glucose를 기질로 하여 실험하였다.

산물생산촉진인자(Flask 배양)

Fig. 4로부터 polysaccharide 생산촉진인자로서의 biotin을 사용하였을 경우, flask 배양에서 특히, CBP의 생산량이 크게 증가됨을 알 수 있었다. 이는 cell의 성장보다는 polysaccharide의 생산에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 이는 uronic acid를 많이 함유하고 있는 polysaccharide의 경우, COOH carrier로 biotin이 polysaccharide의 생산에 중요한 영향을 미치는 것으로 추측된다.

또한 CBP의 최대 생산과 더불어 WSP의 생산을

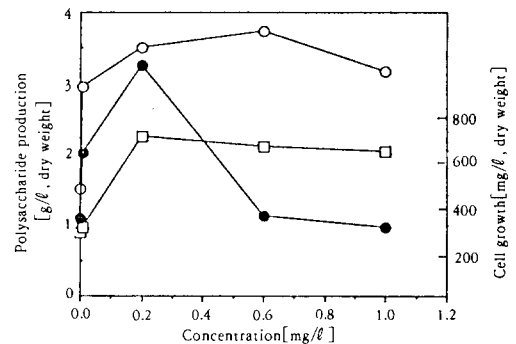


Fig. 4. Effects of biotin concentration on cell growth and polysaccharide production in flask culture, incubated at 30°C for 144hr, pH 7.8(—○— Water-soluble polysaccharide, —●— cell-bound polysaccharide, —□— Dry cell weight,).

증가시키기 위해, 세포막에 영향을 미치는 $MnSO_4$, ampicillin, surfactant를 각각 첨가한 결과, $MnSO_4$ 의 경우는 polysaccharide의 생산보다는 세포의 생산에 더 좋은 영향을 미침을 알 수 있었다(Fig. 5). 그리고 polysaccharide 생산을 위한 ampicillin과 surfactant의 최적 농도는 각각 0.6mg/ℓ, 0.4mg/ℓ

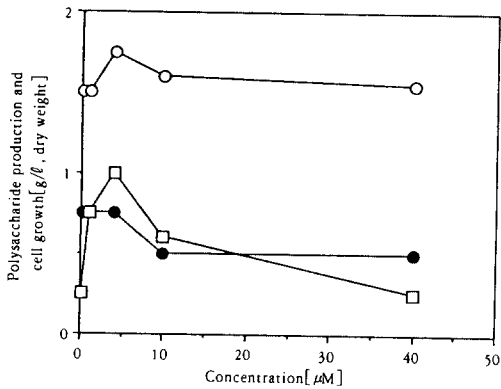


Fig. 5. Effects of $MnSO_4$ concentration on cell growth and polysaccharide production in flask culture, incubated at $30^\circ C$ for 144hr, pH 7.8 (—○— Water-soluble polysaccharide, —●— cell-bound polysaccharide, —□— Dry cell weight).

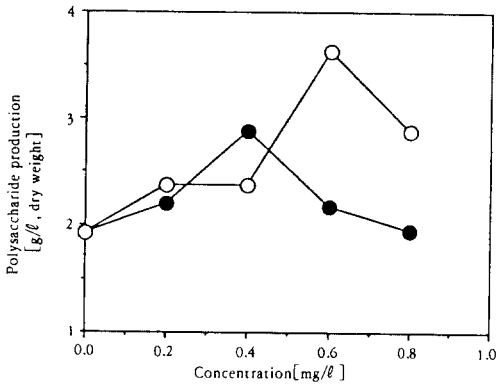


Fig. 6. Effect of ampicillin and surfactant concentration on water soluble polysaccharide production in flask culture, incubated at $30^\circ C$ for 144hr, pH 7.8. Ampicillin and surfactant were added after 48hr incubation (—●— Ampicillin, —○— Tween 80).

이다(Fig. 6). Ampicillin과 surfactant는 세포 성장 자체에 영향을 미치지 않게 하기 위하여 48시간 배양하여 세포 성장 후 첨가하였다. 이상과 같은 생산촉진인자 중에서 surfactant를 첨가하였을 경우 가장 많은 양의 polysaccharide를 생산하였으며, 이는 surfactant로서 사용된 tween 80이 비이온성계로 막의 유동성을 증가시켜 생산을 증가시키며, ampicillin의 경우도 gram negative bacteria에 효과적

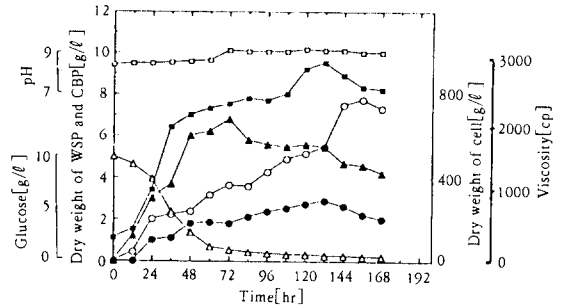


Fig. 7. Time courses of polysaccharide production, cell growth, viscosity, pH, and glucose concentration in the fermentor culture. The fermentation was conducted at $30^\circ C$. Dissolved oxygen was roughly at 2.0ppm (—○— Dry weight of WSP, —●— Dry weight of CBP, —▲— Dry cell weight, —△— Concentration of glucose, —■— Apparent viscosity, —□— pH).

으로 작용해 polysaccharide의 생산이 증가된 것으로 사료된다. 그리고 $MnSO_4$ 의 경우에는 세포막 팽창효과를 이용하여 polysaccharide의 생산을 증가시킬 목적으로 사용하였으나 cell의 양만을 증가시키는 것을 알 수 있다(22).

생장곡선과 Polysaccharide의 생산(Fermentor 배양)

1% glucose를 탄소원으로 fermentor 배양을 하였을 때 세포성장과 polysaccharide 생산량의 관계를 Fig. 7에 나타내었다. 이 결과 기질인 glucose는 48시간에서 72시간 사이에 거의 고갈되었으며, 균체의 양은 기질이 거의 다 소비된 72시간 이후부터는 증가하지 않았고, polysaccharide의 생산은 균의 증식과 동시에 시작되어, WSP의 경우 기질이 완전히 소모된 144시간까지 9.1g/l 정도 생산되었다. CBP의 경우에는 균체증식과 그 생산배도가 거의 같았으며, 132시간에 2.5g/l 생산되었다. Viscosity는 균의 성장과 함께 36시간 정도까지 급속한 증가를 보인 후, 144시간까지는 완만한 증가를 보였다. 이러한 viscosity의 계속적인 증가는 다른 연구자들에 의해 보고된 바와 같이 가지화, 분자량의 증가, polymer의 변형, short-chain들의 결합 등의 이유에 기인되는 것으로 사료된다(20). 또한 viscosity는 144시간 이후에 차츰 감소하였는데, 이것은 pro-

tease, β -galactosidase, β -glucosidase 등의 효소가 배양과정 중에 유도되기 때문인 것으로 사료된다.

요 약

해양으로부터 polysaccharide를 생산하는 세균을 분리하여 동정한 결과 *Zoogloea* sp.(KCCM 10036)로 밝혀졌으며, 이 해양유래 *Zoogloea* sp.는 서로 다른 두종류의 다당류인 수용성다당류(WSP)와 세포결합다당류(CBP)를 동시에 생산하여 지금까지 보고된 관련 미생물과는 다른 특이성을 보였다. 이들 중 WSP는 원심분리 시킨 배양액의 상등액으로부터 acetone 침전법에 의해 분리하였고, CBP는 침전물로부터 acetone 및 cetylpyridinium chloride 처리에 의해 분리하였다. WSP와 CBP는 모두 단백질을 함유하였으나, 이 중 CBP가 보다 높은 단백질 함유율을 나타내었다. WSP를 다량 생산하기 위한 최적 탄소원은 fructose였고, CBP의 경우는 glucose였다. Polysaccharide 생산촉진인자로 biotin, ampicillin, 그리고 surfactant를 각각 배지에 첨가하였을 경우, 각각의 농도가 0.2mg/l, 0.6mg/l, 0.4mg/l에서 생산량이 가장 높은 값을 보였다. 1%의 glucose를 탄소원으로 하여 fermentor 배양하였을 때, 9.1g/l의 WSP와 2.5g/l의 CBP가 생산되었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 특정연구과제 연구비(과제번호: 92-24-00-14)의 지원으로 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. Y. Stainer, J. L. Ingraham, M. L. Weels and P. R. Painter(1986), The microbial world, 5th ed., pp. 145-182, Prentice hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
2. G. O. Aspinall(1982), The polysaccharides, Vol. I, pp. 1-5, Academic press, New York.
3. A. H. Rose and D. W. Tempest(1973), *Adv. Microbiol. Physiol.*, **10**, 136.
4. P. A. Holmes(1985), *Phys. Technol.*, **16**, 32.
5. M. Wrangstadh, U. Szewzyk, J. Ostling and S. Kjelleberg(1990), *Appl. Microbiol.*, **56**, 7, pp. 2065-2072.
6. E. Chillini and R. Solaro(1993), *CHEMTECH*, **23**, 7, pp. 29-37.
7. A. B. Parsons and P. R. Dugan(1971), *Appl. Microbiol.*, **21**, 4, pp. 657-661.
8. F. Ikeda, H. Shuto(1982), *Eur. J. Biochem.*, **123**, pp. 437-441.
9. Y. S. Kang, J. W. Hong, J. D. Kim, M. W. Chang, and J. Y. Kong(1995) The 3rd Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition '95, Abstract, May, pp. 70-71.
10. 강양순, 홍종욱, 배승권, 김종덕, 공재열(1995), 『한국생물공학회 춘계학술대회 논문집』, KAIST.
11. M. W. Chang, Y. S. Kang, J. W. Hong, S. K. Bae, and J. Y. Kong(1995), The first Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference '95, Abstract, September, p. 55.
12. K. J. Kwon, K. J. Park, J. D. Kim, J. Y. Kong, and I. S. Kong(1994), *Biotechnology letters*, **16**, 8, pp. 783-788.
13. 홍종욱, 강양순, 배승권, 김종덕, 공재열(1995), 『한국생물공학회 춘계학술대회 논문집』, KAIST.
14. 장명웅, 김광혁, 공재열(1995), *Korean J. Life Science*, **5**(2), pp. 81-89.
15. 홍종욱, 강양순, 김종덕, 공인수, 공재열(1994), 『한국 생물공학회 추계학술대회 논문집』, 인하대학교.
16. P. K. Noel and G. H. John(1984), "in Bergey's manual of systematic bacteriology", I, pp. 214-219, Ed. by F. U. Richard, Williams & Willkins, London.
17. 福井作藏(1969), 還元糖の定量法, pp. 19-22, 學會出版センター.
18. M. F. Chaplin and J. F. Kennedy(1986), Carbohydrate Analysis, pp. 1-96, IRL press, Oxford.
19. D. M. Bollag and S. J. Edelstein(1991), Protein method, pp. 50-52, A John Willy & Sons, Inc., New York.
20. Y. C. Shin, H. S. Lee, Y. N. Kim, and S. M. Byun(1987), *Biotechnol. Lett.* **9**, pp. 621-624.
21. A. B. Parsons and P. R. Dugan(1971), *Appl. Microbiol.*, **21**, 4, pp. 657-661.
22. 성낙현외 3인(1982), 新版 醱酵工學, pp. 312-320, 형설출판사.