

젖산의 빠른 정량적 분석을 위한 TLC 최적 조건

¹최 미 화 · ²조 갑 수 · ³강 희 경 · ⁴윤 종 선 · ¹서 은 성 · ⁴류 화 원 · ⁵장 세 효 · ⁶윤 승 헌 · ^{4†} 김 도 만
전남대학교 ¹물질 · 생물화학공학과, ²분자생물공학과, ³공업기술연구소, ⁴응용화학공학부, ⁵(주) 진성 SMR,
⁶미국 아이오와주립대학교 생화학과
(접수 : 2002. 12. 2., 개재승인 : 2003. 1. 22.)

Simple and Quantitative Analysis Method for Lactic Acid by TLC

Mi-Hwa Choi¹, Kab-Su Cho², Hee-Kyoung Kang³, Jong-Sun Yun⁴, Eun-Seong Seo¹, Hwa-Won Ryu⁴, Sei-Hyo Chang⁵,
Seung-Hun Yoon⁶, and Doman Kim^{4†}

¹Department of Material Engineering and Biochemical Engineering,

²Department of Molecular Biotechnology, ³Engineering Research Institute,

⁴Department of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

⁵Jin-Seong SMR Ltd., Gwangju 500-757, Korea,

⁶Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA

(Received : 2002. 12. 2., Accepted : 2003. 1. 22.)

TLC condition was developed for its simple separation and quantitative analysis of lactic acid. Rapid and clear separation of lactic acid by silica gel TLC plate was obtained by using nitromethane : 1-propanol : H₂O (2 : 5 : 1.5, v/v/v) and a suitable dipping solution of 40 mg bromocresol purple in 100 mL 50% ethanol (pH 10.0). The lactic acid was shown as a bright yellow spot on a light cinnabar background. The quantitatively detectable concentration range of lactic acid was between 0.5 and 4% with 99.4% confidence. Quantitative TLC analysis result was confirmed with HPLC and with enzymatic quantitative analysis methods (by using lactate dehydrogenase).

Key Words : TLC (Thin layer chromatography), lactic acid, bromocresol purple, quantitative analysis method, separation

서 론

젖산(CH₃OHCOOH)은 부드러운 신맛의 무색, 무취, 저휘발성의 물에 잘 녹는 유기산으로 인체에 독성이 없어 FDA에 의해 GRAS(generally recognized as safe)로 승인되어 향미제, 산미제, 식품의 보존제 등의 식품관련 산업에 널리 이용되고 있다. 젖산의 생산 공정은 크게 석유로부터 유도된 에틸렌으로부터의 합성공정과 재생 가능한 생물자원으로부터 미생물에 의해 생산되는 발효공정으로 나뉘는데 광학적 이성질체의 선택적 생산가능성, 환경친화성 등의 이유로 후자에 대한 연구가 집중되고 있다(1-2). 이를 위하여 젖산 생산성이 우수한 균의 선별에 관한 연구가 많이 수행되고 있으며, 이 과정 중 많은 시료들 중에 있는 젖산의 양을 간편하게 정량

적으로 빨리 확인할 수 있는 방법이 필요하겠다(3-5). 분석 방법은 시료 중에 있는 여러 가지 물질들 중에서 분석하고자 하는 물질에 대한 선택성이 있어야 한다. 가장 널리 쓰이는 분석 방법은 크로마토그래피법이고 과학 분야에서 널리 이용되고 있다(6). 크로마토그래피는 보통 이동상과 정지상에 따라 분류한다. 박막 크로마토그래피 (Thin-Layer Chromatography; TLC)와 관 액체 크로마토그래피는 이런 정지상과 이동상의 종류 및 용용 면에서 대단히 비슷하다. 실제로 TLC 분석법은 관액체 크로마토그래피의 최적 조건을 얻는데 활용되기도 한다(6-8). 또한, TLC 분석법은 제약산업에서 생활용품의 순도를 판별하는 중요한 역할을 하고 있고, 임상 실험, 생화학 및 생물체 연구, 그리고 산업현장의 실험실에서도 널리 쓰이고 있다(9). 최근에는 TLC 분석방법 대신 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)가 많이 사용되고 있다. 그러나 HPLC 분석법에 사용되는 컬럼과 용매의 가격이 비싸고 분석 시간이 오래 걸리며 기기의 사용이 복잡하고 시료, 충진제, 용매 3자간의 물리·화학적 상호작용을 고려해야 하기 때문에 분리 전개에 다소 전문성이 필요하다. 이러한 면에서 TLC는 HPLC의 한계와 단점을 극복할 수 있는 좋은 대체 혹은 보완 방법이라

† Corresponding Author : Department of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

Tel: +82-62-530-1844, Fax: +82-62-530-1849

E-mail: dmkim@chonnam.ac.kr

하겠다(10-11). TLC를 이용한 정량 분석은 densitometer를 사용하는 방법이 주를 이루고 있으며, 최근에는 구성 탄수화물 확인, 분해 효소들의 특성과 반응 기작 연구에 있어 정량적인 데이터를 얻는데 꾸준히 사용되고 있다(10, 12-14).

본 연구에서는 젖산의 정성적 분석만을 위해 보편적으로 사용되어왔던 TLC 조건(15)을 보완하여, 4% 농도까지의 젖산이 들어있는 다수의 시료를 동시에 그리고 간편하게 정량, 정성분석을 하기 위한 TLC의 최적 조건을 개발하였고, 이 조건의 유효성을 HPLC(16)와 효소적 분석 방법(17)으로 확인하였다.

재료 및 방법

TLC를 이용한 젖산 분석

TLC 전개는 사각 chamber ($10 \times 24 \times 24 \text{ cm}$)에서 수행하고, silica gel TLC plate는 Merck사 (Germany)에서 구입하였고, 그 외 시약들은 일반 등급 시약을 사용하였다. Plate들은 $10 \times 20 \text{ cm}$ 의 크기로 잘라서 사용하였다. 유기산 분리를 위해 사용되어오던 TLC 전개용매와 본 연구에서 젖산의 정량 분석을 위해 개발하여 유효성을 비교한 전개용매의 조성은 (1) Diisopropyl ether : Formic acid : H_2O (90 : 7 : 3 - v/v/v)(15), (2) Nitroethane : Nitromethane : Ethanol : 1-Propanol (1 : 2 : 3 : 4 : 5 - v/v/v/v/v)(12-14) 그리고 (3) Nitromethane : 1-Propanol : H_2O (2 : 5 : 1.5 - v/v/v)(this study)이었다. 젖산 표준 용액 (Aldrich사; L-6402)은 0.5% - 4%(w/v)의 농도로 준비하였다. 여러 가지 발색시약 중 젖산 확인에 좋은 시약은 3가지였는데(15), 시약 I은 Bromocresol purple (40 mg)을 50% 에탄올 100 mL에 녹인 후, 6 M NaOH를 이용하여 pH를 10으로 맞추어 준비하고, 시약 II는 Bromocresol purple (100 mg)을 100% 에탄올 100 mL에 녹인 후, 색깔이 변할 때까지 10%의 암모니아용액을 떨어뜨려서 준비하고, 시약 III은 Bromocresol green (40 mg)과 Bromophenol blue (15 mg)를 100% 에탄올 100 mL에 녹인 것과 과망간산칼륨 (250 mg)과 탄산나트륨 (500 mg)을 물 100 mL에 녹인 것을 9 : 1 (v/v)로 혼합시켜 준비하였다. 각 시료용액은 미량 피펫을 이용하

여 plate의 끝에서 15 mm 되는 위치에 $1 \mu\text{l}$ 접적하였다. 접적의 직경은 되도록 최소가 되게 하였으며, 각 접적 간의 간격은 9 mm 이상을 유지하였다. 전개가 끝난 TLC plate는 건조시킨 후, 발색 시약에 담갔다가 건조하고 120°C 의 오븐에서 15 - 20 min 정도 발색 시켰다. 발색한 TLC plate는 NIH Image Program을 이용하여 젖산 spot의 면적에 따른 밀도를 분석하였다(12, 14).

HPLC 이용한 젖산 분석

시료는 TLC 분석 방법과 동일하게 준비하였고, HPLC (LC-6A, Shimadzu Co., Kyoto) 분석을 위해서 젖산 표준 용액을 0.05 - 0.2%로 준비하였다. 각 시료는 cellulose nitrate membrane filter (0.2 μm , MFS, Inc., USA)를 통과시켜 오염 물질들을 제거하였다. 사용한 column은 Coregel 87H3 (BioRad, Hercules, CA) 이었고 column 온도는 30°C , eluent는 8 mM H_2SO_4 , flow rate는 0.5 mL/min, injection volume은 $20 \mu\text{l}$ 이었고 refractometer는 RID-6A (Shimadzu, Kyoto)를 사용하였다(16).

Lactate dehydrogenase를 이용한 젖산 분석

총 젖산량은 L(+)와 D(-) 젖산에 특이적으로 반응하는 효소를 따로 이용하여 분석한 후 각각의 양을 합하여 결정하였다. NAD^+ 가 포함된 두 개의 vial에 glycine buffer, L(+) 또는 D(-)-Lactate dehydrogenase (Sigma사; L-2500, L-2395)와 물을 섞어주고 이 혼합물에 시료를 넣고 37°C 에서 15분간 반응시킨 후, 340 nm에서 흡광도를 측정하여 총 젖산 양을 결정하였다(17).

결과 및 고찰

TLC를 이용한 젖산의 분리 및 정량분석

시료의 종류가 많을 때 들어 있는 젖산을 분석하는 빠르고 간편한 방법으로 TLC를 많이 사용하고 있다 (19). 하지만 지금까지 사용하는 전개용매는 시료중의 젖산을 정성적으로 확인 할 수는 있지만 정량적으로 분석하는 경우에는 사용 할 수 없으며, 따라서 본 연구에서는 유기산(16, 20-21)과 탄수

Table 1. Characterizations of developing solvent systems and dipping reagents for lactic acid identification and quantitative analysis

Developing solvent system	Minute for ascending	Dipping solvent system	Background color	Spot color
1	15	I	Dark Yellow	Light Yellow
		II	Deep Yellow	Light Yellow
		III	Gray-Blue	Light Yellow
2	60	I	Dark Yellow	Yellow
		II	Deep Yellow	Yellow
		III	Bright Blue	Blue
3	30	I	Light Cinnabar	Bright Yellow
		II	Deep Yellow	Bright Yellow
		III	Blue	Blue-Yellow

Solvent system 1; Diisopropyl ether : Formic acid : H_2O = 90 : 7 : 3 (v/v/v), Solvent system 2; Nitroethane : Nitromethane : Ethanol : 1-Propanol = 1 : 2 : 3 : 4 : 5 (v/v/v/v/v), Solvent system 3; Nitromethane : 1-Propanol : H_2O = 2 : 5 : 1.5 (v/v/v).

Reagent I; Dissolved 40 mg bromocresol purple in 100 mL of 50 % ethanol and adjusted pH to 10.0 with 1M NaOH solution, Reagent II; Dissolved 100 mg bromocresol purple in 100 mL ethanol and added a few drops of 10 % ammonia solution until the color changed from orange to deep violet, Reagent III; Mixed solutions a and b to a ratio of 9 to 1(v/v) immediately before use

Solution a; Dissolved 40 mg bromocresol green and 15 mg bromophenol blue in 100 mL ethanol.

Solution b; Dissolved 250 mg potassium permanganate and 500 mg sodium carbonate in 100 mL water.

화물의 분석(23-27)에 많이 이용되고 있는 여러 가지의 TLC 전개 용매들의 젖산 분리능을 실험하였고 (결과 보이지 않음) 그 중 젖산의 양을 가장 간편하고 정량적으로 확인할 수 있는 TLC 조건을 개발하였다. TLC에 의한 분석 방법은 짧은 시간 내에 많은 시료를 동시에 확인할 수 있고 비용이 적게 든다는 이점이 있어, 최근 탄수화물 관련 연구에 많이 사용되고 있고, 분석하고자 하는 탄수화물에 따라 특별한 전개용매와 발색시약이 다양하게 개발되어왔다(12-14). 더군다나 TLC는 시료 중 분석하려는 물질의 농도가 높고 분석해야 할 시료의 수가 많은 경우, HPLC 등의 방법보다 희석이 필요 없거나 많지 않고 filtration등의 전처리 과정이 필요 없어 분석 과정의 간편성과 분석 시간에 있어서 매우 효율적이다. TLC 분석 방법에서 중요한 점은 시료의 종류에 따라 특별한 조성의 전개용매와 발색시약을 사용하면 이 용매들의 조성에 따라 분석하고자 하는 물질의 전개되는 정도와 spot 색깔이 다르게 나타난다는 것이다(Table 1). 일반적으로 유기산의 전개용매로 (1)번 용매가 널리 사용되어왔으나(15) 젖산의 경우 분리가 명확히 되지 않았으며 정량적인 분석 방법으로 사용하기에도 어려웠다. 따라서 이를 보완하기 위하여 전개 용매 (3)번의 조건을 개발하였으며 이 조건에서 젖산은 발색 시약 A를 사용하면 TLC plate 상에서 짙은 주홍색 바탕에 밝은 노란색 점으로 확인되었다(Table 1, Fig. 1-A). 각 전개용매의 전개시간은 달라 (2)번 용매는 (3)번 용매와 비교하였을 때, 젖산의 분리 확인은 가능하였으나, 전개 시간이 너무 오래 걸린다는 단점이 있었으며, 분리되는 spot의 선명도도 (3)번의 용매보다 떨어져 정량적 분석조건으로는 적합하지 않았다. (3)번 용매의 경우 젖산의 R_f 값은 0.4이었고, 이형젖산발효에서 흔히 생성되는 아세트산의 경우는 R_f 값이 0.6으로 두 유기산의 구분이 쉬워 동형젖산발효나 이형젖산발효에 의해 생산되는 두 경우 모두의 젖산 생산 확인에 용이하였다.

Table 2. Quantitative analysis of lactic acid by using HPLC, TLC, and lactate dehydrogenase kit

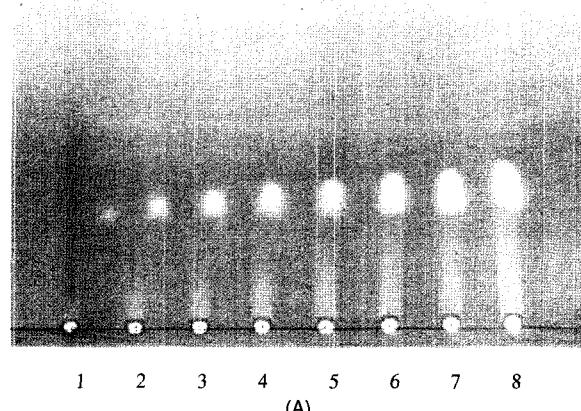
HPLC (g/L)	TLC (g/L)	LDase Kit* (g/L)
16.8(± 0.3)	16.7(± 0.3)	L(+): 9.2(± 0.1)
		D(-): 6.9(± 0.1)
		Total: 16.1(± 0.2)

A solvent (3) for separation and a reagent (I) for visualization were used. *Lactate dehydrogenase kit

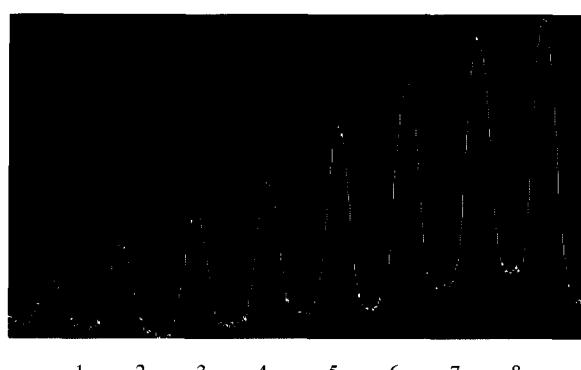
TLC를 이용한 젖산의 정량분석

젖산의 분석 조건 중 (3)번 전개용매와 (I)번 발색시약 조건을 이용하여 표준 젖산을 0.5 - 4% 범위에서 정량 분석을 한 경우 99.4%의 신뢰도로 정량 분석이 가능함을 확인하였다. Table 2는 HPLC와 lactate dehydrogenase를 이용하여 젖산의 양을 TLC 분석 방법으로 개발된 조건에서 동시에 확인한 결과이며 TLC를 이용한 정량 방법이 두 방법에서 얻어진 수치들과 비슷함을 확인할 수 있었다. TLC를 이용한 젖산의 정량 분석에서 16.7 g/L의 값을 보이는 시료의 경우 HPLC를 이용한 분석 방법으로는 16.8 g/L의 값을 보였고, 효소적 정량 방법으로는 두 가지 형태의 젖산 (L, D 형태)의 총합이 16.1 g/L의 수치를 보여 TLC 분석 방법과 그로부터 얻은 결

과를 신뢰할 수 있었다.



(A)



(b)

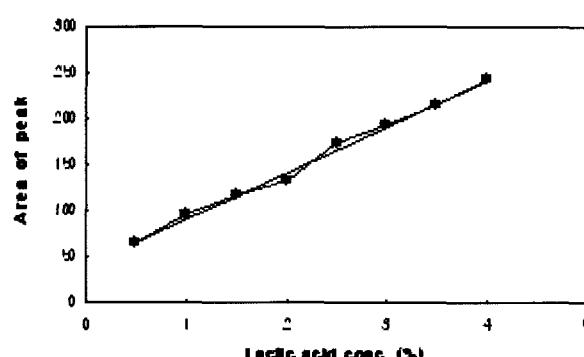


Figure 1. Thin layer chromatograms of lactic acid by using a solvent (3) for separation and a reagent (I) for visualization
 (A) Separation of lactic acid; Lane 1 - 8 : Lactic acids standard solutions (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 and 4%-w/v, respectively), (B) NIH Image Program tracing of spots from (A), (C) Area of each peak obtained from (B) (R^2 ; 0.9944)

유기산을 생산하는 미생물을 선별하는 과정에서는 많은 시료들의 빠르고 정확한 분석이 필요한데, 현재 유기산(특히 젖산) 분석에 많이 쓰이고 있는 HPLC에 의한 분석은 각 샘플 당 20 min 가량의 시간이 소요된다. 그러므로, HPLC 분석법으로 많은 샘플을 분석할 때에는 너무 많은 시간이 필요하다(18-19). 그러나 TLC (10 x 20 cm) 분석법은 20개 이하의 샘

풀을 한꺼번에 분석할 수 있고 적어도 한 chamber에서 동시에 두 개의 TLC plate를 전개 할 수 있어 한꺼번에 약 40개의 시료를 분석할 수 있다. 본 연구에서 개발한 방법을 이용하는 경우 실온에서 전개 시 접적한 위치에서 7 cm 윗쪽에 젖산이 도달하도록 전개하는데 걸리는 시간은 30 min이며, 발색 시간 등을 포함하여 한번의 분석에 필요한 총 분석 시간은 약 55 min이었다. 따라서 0.5 - 4%의 범위에서 젖산 농도를 가진 시료의 경우는 회석 없이 시료 중 젖산을 분리하고, 정량적으로 분석할 수 있으며, 이 방법은 0.05 - 0.2%의 낮은 농도의 젖산을 가진 시료를 분석할 수 있는 HPLC 방법과 서로 보완하여 사용할 수 있겠다.

요약

TLC를 이용하여 시료에 있는 젖산을 간편하고 신속하게 분리하고 정량 분석 할 수 있는 조건을 개발하였다. Silicagel TLC plate를 사용하는 경우 전개용매로 Nitromethane : 1-Propanol : H₂O를 2 : 5 : 1.5 (v/v/v)의 비율로 섞어 사용하고 발색시약으로 Bromocresol purple을 50% 에탄올 100 mL에 녹여(pH 10) 준비한 Bromocresol purple reagent를 사용하였을 때, 젖산은 짙은 주홍색의 TLC plate의 바탕에 밝은 노란색 spot으로 확인되었으며 이 조건으로 0.5 - 4% 농도 범위의 젖산을 포함한 시료를 회석 없이 99.4%의 신뢰도로 쉽게 정량 분석할 수 있었고, 개발한 조건의 유효성은 HPLC 와 lactate dehydrogenase를 이용한 젖산 정량 분석으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 에너지관리공단 에너지·자원기술개발 사업에 의하여 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Global report (2000), Cargill Dow to start up giant PLA plant, *Modern Plastics*, **77**, 11-18.
- Tsai, S. P., R. Datta, M. Henry, Y. Halpern, and J. R. Frank (1999), Production of organic acids by electrodialysis/pervaporation process, *Memb. Technol.*, **109**, 8-12.
- Suarez, V. B., A. Quibroni, A. G. Binetti, and J. A. Reinheimer (2002), Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries, *J. Food Prot.*, **65**, 41-60.
- Park, Y. S., J. Y. Lee, Y. S. Kim, and D. H. Shin (2002), Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from dongchimi, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 25-31.
- Choi, H. J., C. I. Cheigh, S. B. Kim, J. C. Lee, D. W. Lee, S. W. Choi, J. M. Park, and Y. R. Pyun (2002), Weissella kimchii sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 11-50.
- Guen, S. H., Y. S. Guen, Y. S. Kim, G. C. Park, Y. J. Yun, G. Y. Cha, and H. S. Choi, (1999), The Principle of Instrument Analysis, p789-893, Liberty Academy.
- Choi, J. S. (1994), The Introduction of Instrument Analysis, p282-375, Shin-Gwang.
- Park, C. I. and C. H. Lee (1993), The theory and practice of HPLC, p1-7, Liberty Academy.
- Gorden, M. H. and R. Macrae (1992), Instrumental analysis in the Biological Science, p35-74, Gou-Bo.
- Robyt, J. F., and R. Mukerjea (1994), Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin layer chromatography, *Carbohydr Res.*, **251**, 187-202.
- Li, E. G. (1992), The present condition and future of organic acid fermentation industry, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 60-75.
- Kim, D., Y. M. Kim, M. R. Park, H. J. Ryu, D. H. Park, and J. F. Robyt (1999), Enzymatic modification of cellulose using *Leuconostoc mesenteroides* B-742CBM dextranase, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 529-533.
- Ki, H. S., D. Kim, H. J. Ryu, and J. F. Robyt (2000), Cloning and sequencing of the α-1→6 dextranase gene from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 559-563.
- Baek, J. S., D. Kim, J. H. Lee, P. S. Chang, N. S. Han, and J. F. Robyt (1998), Enzymatic synthesis of new oligosaccharide using glucansucrases, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 179-186.
- Jork, H., W. Funk, W. Fischer, and H. Wimmer (1990), Thin-Layer Chromatography (Reagents and detection methods), VCH, 229-233.
- Yu, J. S. and H. W. Ryu (2001), Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1, *Proc. Biochem.*, **37**, 235-240.
- Bernard, B., T. Ferain, D. Garmyn, P. Hols and J. Delcour (1991), Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*, *FEBS*, **290**, 61-64.
- Oztunc, A., A. Onal and S. Erturk (2002), 7.7.8.8-Tetracyanoquinodimethane as a new derivatization reagent for high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography: rapid screening of plasma for some antidepressants, *J. Chromatogr. B*, **774**, 149-155.
- Lee, K. Y., J. S. So, and T. R. Heo (2001), Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level, *J. Microbiol. Meth.*, **45**, 1-6.
- Hofvendahl, K., E. W. J. van Niel, and B. Hahn-Hägerdal (1999), Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 669-672.
- Hujanen, M., S. Linko, Y. Y. Linko, and M. Leisola (2001), Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 126-130.
- Kim, D. and J. F. Robyt (1995), Production, selection, and characteristics of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-742 constitutive for dextranase, *Enzyme Microbial Technol.*, **17**, 689-695.
- Kim, D., S. J. Ryu, S. J. Heo, D. W. Kim, and H. S. Kim (1999), Characterization of a novel carbohydrate from *Lipomyces starkeyi* KSM 22 for Dental Application, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 260-264.
- Lee, J. H., D. Kim, H. J. Ryu, S. J. Heo, D. Y. Jhon, N. S. Han and J. F. Robyt (1998), Modification of pullulan using dextranase and characterization of the modified pullulan, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 264-268.
- Kim, D., K. H. Park, and J. F. Robyt (1998), Acarbose effect for dextran synthesis, acceptor and disproportionation reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextranase, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 287-290.
- Hofvendahl, K., E. W. J. van Niel, and B. Hahn-Hägerdal (1999), Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 669-672.
- Hujanen, M., S. Linko, Y. Y. Linko, and M. Leisola (2001), Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 126-130.