

미생물을 이용한 생리 활성 물질의 생산

제 2 보 : *Rhodotorula rubra*로 부터 균체 성분의 추출

오두환 · 변유량 · 유승곤 · 유주현
연세 대학교, 공과 대학, 식품 공학과
(1980년 4월 3일 접수)

Production of Biological Activator by Microorganisms

II. Extraction of Cellular Materials from *Rhodotorula rubra*

Doo Hwan Oh, Yu Ryang Pyun, Seung Kon Ryu and Ju Hyun Yu
Department of Food Engineering, College of Engineering, Yonsei University, Seoul
(Received April 3, 1980)

Abstract

The extraction mechanism and extraction conditions of cellular lipid of freeze-dried cells of *Rhodotorula rubra* YUFE 1526, which was reported as coenzyme Q producing microorganism, were studied.

1. Methyl alcohol was the most appropriate solvent for extraction of cellular lipids and the resulting total lipid was 19.17 weight %.
2. When 1 % (w/v) of freeze-dried cell was extracted by methyl alcohol, the extraction yield was 90.49 % at 50°C for 2 hr.
3. The diffusivity varied with extraction temperature and the empirical equation was derived as follows : $2.2 e^{0.02907T} \times 10^{-9} \text{ mm}^2/\text{min}$.
4. The diffusivity of cellular lipid of *Rhodotorula rubra* YUFE 1526 was $9.4 \times 10^{-9} \text{ mm}^2/\text{min}$.
5. The extraction model was well fitted on the extraction of cellular lipid.

서 론

미생물은 단세포 단백질, 항생 물질, 생리 활성 물질, 효소 및 기타 유용 물질의 생산등에 다양하게 이용이 되고 있다. 그러나 지금까지의 미생물 이용이나 미생물에 대한 연구는 대사 산물의 생합성 과정, 유용 물질의 생산 조건이나 방법 및 정제 과정에 관한 것이 거의 대부분이었으며 균체내 물질을 추출해 내는 추출 機作에 대하여서는 보고되어 있지 않은 실정이다.

시료로 부터 가용성 물질의 추출 機作은 시료 조직 안으로 용매가 투과하는 것을 허용하지 않고 용매의 농도와는 무관하게 포화 용액이 될때 까지 물질의 추출

속도가 일정한 모세관 현상계와, 용매의 침투에 의하여 가용성 추출 물질의 농도 구배가 생기며 추출 속도가 bulk 용액내의 추출물의 농도에 따라 변화되는 확산계의 2가지로 크게 나눌 수 있다⁽¹⁾.

한편 천연물로 부터 생리 활성 물질과 유용 물질을 추출하는 방법과 機作에 대하여서는 밤송이로 부터 색소 추출⁽²⁻⁴⁾, 대두로 부터 대두유의 추출⁽⁵⁾, 어유의 추출⁽⁶⁾ 및 인삼 성분의 추출^(7,8) 등이 보고되고 있다. 이들 중 대두로 부터 대두유의 추출 機作은 모세관 현상계로서 알려지고 있으나⁽⁵⁾, 나머지 대부분의 천연물로 부터의 추출은 확산에 의한 것으로 알려지고 있다^(2-4,6-8).

본 연구는 미생물 균체내의 생리 활성 물질과 유용

물질을 추출하는 수학적 모델 설정과 추출 機作을 확인하고 저 생리 활성 물질인 coenzyme Q의 생산균으로 보고된 *Rhodotorula rubra* YUFE 1526을 사용하여 연구하였다⁽⁹⁾. 이때 생리 활성 물질인 coenzyme Q는 추출된 유지중에 존재하며, 그의 양은 유지의 추출된 량과 비례하므로 대신 추출된 유지를 정량하여 고찰하였다.

Table 1. Composition of culture medium of *Rhodotorula rubra* YUFE 1526

Composition	Contents, w/v %
Yeast extract	0.4
Malt extract, powder	0.5
Malt extract, 10° blg	100 ml
Tap water	900 ml
Glucose	0.4
pH	5.0

재료 및 방법

균주 및 균주의 배양

본 연구에 사용한 균주는 *Rhodotorula rubra* YUFE 1526이었다. 이 균주를 Table 1과 같은 YM 개량 배지를 사용하여 삼각 후라스크와 20 l의 jar fermentor에서 2회 전 배양한 뒤, jar fermentor의 배양액을 200 l의 발효조에 접종하여 온도 30°C, 통기량 0.8 vvm의 조건하에서 32시간 동안 배양하였다.

시료의 조제

Rhodotorula rubra YUFE 1526의 배양액을 10,500 ×g에서 15분간 냉동 원심 분리(Kokusan model H-251)하여 균체를 회수한 다음, 냉동 건조(Shimadzu M-5)하였다. 그후 이를 마쇄하고 100 mesh로 체질하여 체를 통과한 균체를 냉장고에 밀봉하여 보관하면서 시료로 사용하였다.

균체의 성분 분석

균체의 일반 성분을 총당은 Bertrand 법⁽¹⁰⁾, 조 단백질은 micro Kjeldahl 법⁽¹¹⁾, 유지는 Soxhlet 법⁽¹²⁾(24 hr)

Table 2. General composition of freeze-dried cells of *Rhodotorula rubra* YUFE 1526

Composition	Contents, wt %
Moisture	7.59
Crude protein	15.72
Crude lipid	13.47
Total sugar	40.98

및 수분은 105°C 상압법으로 분석한 결과, 조 단백질은 15.72%, 총당이 40.98%, 유지가 13.47%, 수분은 7.59%이었다 (Table 2).

시 약

Wako 社의 시약용을 사용하였으며, yeast extract와 malt extract는 Difco Laboratories 제품을 사용하였다.

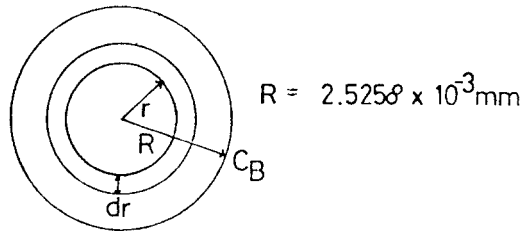


Fig. 1. Section of a single model cell of *Rhodotorula rubra* YUFE 1526

추출 모델의 설정

회분조 내에서 화학 반응이 없는 확산에 있어서는 Fick's 제 2 법칙이 잘 적용된다. 따라서 본 연구에서는 *Rhodotorula rubra* YUFE 1526의 냉동 건조 균체로부터 유지의 추출 과정을 다음과 같은 가정을 두어 고찰하였다.

- (1). *Rhodotorula rubra* YUFE 1526의 세포 모양은 구형이다 (Fig. 1).
- (2). Cell로부터 유지의 추출 과정은 확산 과정에 의해서이다.
- (3). 유지는 균체내에 균일하게 함유되어 있다.
- (4). 균체 표면에서의 용매로의 유지의 전달 저항은 무시할 수 있다.
- (5). 물리적인 성질들은 일정하다.

이상의 가정하에서 한개의 냉동 건조 물체에 대한 유지의 확산 물질 수지식은 다음과 같이 표현된다.

$$r^2 \frac{\partial C_A}{\partial t} = D \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_A}{\partial r} \right) \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{초기 조건 : } C_A(r, 0) = C_{AO} \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{경계 조건 : } C_A(R, t) = C_B \dots\dots\dots(3)$$

$$\frac{\partial C(0, t)}{\partial r} = 0 \dots\dots\dots(4)$$

한편 bulk 용액내의 유지 농도는 다음 식으로 표시할 수 있다^(7,13).

$$\frac{dC_B}{dt} = - \frac{3(1-\epsilon)}{\epsilon R} D \left. \frac{\partial C_A}{\partial r} \right|_{r=R} \dots\dots\dots(5)$$

$$\theta_B = \frac{C_{AO} - C_B}{C_{AO} - C_{BO}} = \frac{\alpha}{1 + \alpha} + 6\alpha \sum_{k=1}^{\infty} \frac{e^{-\frac{n k^2 D}{R^2} \cdot t}}{\alpha^2 n k^2 + 9(1 + \alpha)} \dots\dots\dots(6)$$

式 (6)에서 추출 시간이 충분히 크게 되면 급수의 첫 항만을 고려해도 되므로 式 (6)은 式 (7)로 쓸수 있고

$$\frac{C_{AO}-C_B}{C_{AO}-C_{BO}} = \frac{\alpha}{1+\alpha} + 6\alpha \left[\frac{e^{-\frac{n^2 D}{R^2} t}}{\alpha^2 n^2 + 9(1+\alpha)} \right] \dots\dots\dots(7)$$

이 式 (7)로부터 式 (8)을 얻는다.

$$\ln \frac{(1-\epsilon)C_{AO} + \epsilon C_{BO} - C_B}{C_{AO} - C_{BO}} = \ln \frac{6\epsilon(1-\epsilon)}{\epsilon^2 n^2 + 9(1-\epsilon)} - \frac{n^2 D}{R^2} t \dots\dots\dots(8)$$

式 (8)을 $\ln \frac{(1-\epsilon)C_{AO} + \epsilon C_{BO} - C_B}{C_{AO} - C_{BO}}$ 와 t 와의 관계로

도시하면 직선을 얻게 되며, 이때 얻어지는 직선의 기울기 m 으로 부터 확산도를 구할수 있게 된다.

유지의 추출

유지의 추출은 Fig. 2와 같은 추출조 내에 일정량의 시료를 가한 다음, 미리 추출 온도로 평형 시킨 용매를 가해 항온하에서 교반하면서 추출하였다. 그후 추출조

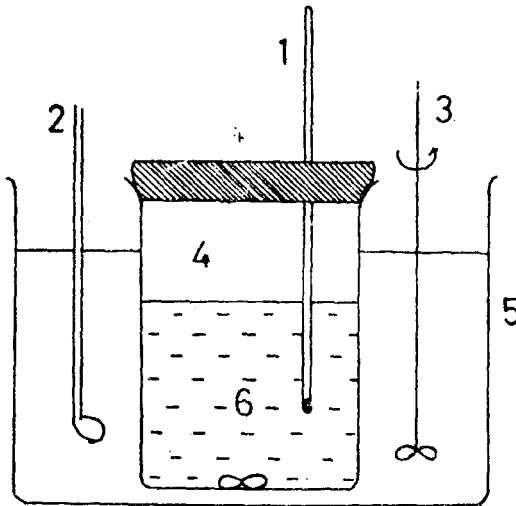


Fig. 2. Diagram of batch extractor

- 1. Thermometer
- 2. Thermostat
- 3. Agitator
- 4. Extractor
- 5. Water bath
- 6. Solvent

내의 내용물을 Toyo 기름 종이 No. 5C로 여과하고 잔사를 다시 소량의 용매로 세척하여 이때 얻어지는 여액을 유지의 추출액으로 하였다.

추출 유지의 정량

용매를 사용하여 추출한 유지는 Folch등⁽¹⁴⁾의 방법을 이용하여 정제하였다. 추출액을 분액 깔대기에 넣고 추출액의 2배량(v/v)의 클로로포름을 가해 3분간 혼합하였다. 여기에 다시 10배량의 증류수를 가해 혼

들어준 다음 방치하여 클로로포름 층을 분리하고 분리된 클로로포름 층을 50°C이하에서 감압 농축한 뒤 80°C에서 항량이 될때 까지 진조하여 그 무게로서 추출유지량을 구하였다.

균체내의 유지 농도, 추출 유지량 및 잔존 유지량의 계산

균체중에 함유되어 있는 추출이 가능한 유지의 총량 (W_0)과 임의의 추출 시간 (t)에서의 용매내에 함유된 추출 유지량 (W_E)으로 추출율 (C_E) 및 잔존율 (C_R)을 구하였다.

$$C(t) = \frac{W_0 - W_E}{W_0} \dots\dots\dots(9)$$

$$C_E (\%) = \frac{W_E}{W_0} \times 100 \dots\dots\dots(10)$$

$$C_R (\%) = \frac{W_0 - W_E}{W_0} \times 100 \dots\dots\dots(11)$$

Bulk 용액내의 유지 농도

용매와 균체를 합한 부피를 V , 용매의 hold-up을 ϵ 라 하면 추출 용매내의 유지 농도(C_B)는 다음식으로 계산할수 있다.

$$\epsilon V(C_B - C_{BO}) = (1-\epsilon)VC(C_{AO} - \bar{C}) \dots\dots(12)$$

$$C_B = \frac{1-\epsilon}{\epsilon} (C_{AO} - \bar{C}) + C_{BO} = \frac{1-\epsilon}{\epsilon} \left(\frac{W_E}{W_0} \right) + C_{BO} \dots\dots\dots(13)$$

확산도의 계산

式 (8)에서 $\ln \frac{(1-\epsilon)C_{AO} + \epsilon C_{BO} - C_B}{C_{AO} - C_{BO}}$ 와 t 와의 관계를 도시하였을 때에 얻어지는 직선의 기울기 m 으로 부터 유지의 확산도 값(D)을 구하였다.

$$D = \frac{R^2}{n^2} m \dots\dots\dots(14)$$

결과 및 고찰

추출 용매의 선정

균체 유지의 추출에 있어서, 유지의 추출률이 가장 좋은 단일 용매를 선정하기 위하여, 1% (w/v)의 균체를 가한 다음 50°C에서 2시간 동안 각각의 용매에서 추출하였다⁽¹⁵⁻¹⁹⁾.

그결과 Table 3에서 볼 수 있는 바와 같이 메틸알코올, 에틸알코올, 아세톤등의 순서이었으나, 경계를 한 결과 메틸알코올에서는 16.2%, 에틸알코올 7.5%, 아세톤 6.4%의 추출률을 보였으며 나머지 용매에서는 큰 차이가 없었다. 따라서 이하에서는 메틸알코올을 추출 용매로 사용하였다.

유지 추출에 대한 교반 속도의 영향

유지 추출에 있어서의 교반의 효과는 유지 원료와

Table 3. Effect of extraction solvents on the extraction of cellular lipid of *Rhodotorula rubra* YUFE 1526

Solvents	Extraction yield, wt %
Acetone	8.1
Benzene	4.5
Ethyl alcohol	10.9
Ethyl ether	5.3
Hexane	4.0
Isooctane	3.5
Methyl alcohol	23.7

100 ml of solvent/g of freeze-dried cells and at 50°C for 120 min. Agitation speed is 200 rpm

추출 용매와의 평형을 돕는 것으로 알려지고 있다⁽¹⁰⁾. 따라서 균체 유지의 추출에 대한 교반 속도의 영향을 검토하기 위하여 50°C, 1% (w/v)의 균체 농도에서 200 rpm, 400 rpm, 600 rpm의 교반 속도로 2시간 동안 추출하였다. 그 결과 균체 유지의 추출물은 교반 속도에 관계없이 90% 정도로 거의 일정한 값을 나타내었다. 이는 추출 모델의 설정에서 가정한 바와 같이 균체 표면에서 용매로의 유지의 전달 저항은 무시할 수 있는 것으로 생각된다.

Extractable total lipid의 량

미생물 균체내의 유지는 "extractable lipid", "bound lipid", "lipid A"등으로 나눌 수 있다. 본 실험에서는 균체로부터 추출이 가능한 유지의 총량을 결정하기 위하여 건조 균체 g당 100 ml의 메틸알코올을 가한 다음 50°C에서 30분씩 5회 반복 추출하여 추출액을 함께 모은 뒤 감압, 농축하고 항량 건조하여 이의 무게를 균체에 대한 중량비로 계산하였다. 그 결과 유지 추출량은 19.17%이었으며, 이를 균체내의 "extractable lipid"의 량으로 결정하였다. 이러한 유지 추출량은 *Rhodotorula rubra*의 유지 추출량이 13.4%이라는 Woodbine⁽²¹⁾의 보고 보다는 5.8% 정도가 많았다.

유지 추출에 대한 온도의 영향

유지의 추출에 미치는 추출 온도의 영향을 검토하기 위하여 균체의 농도를 1% (w/v)로 하여 20, 30, 40, 50 및 60°C에서 2시간 동안 추출하였다. Fig. 3에서 볼수 있는 바와 같이 50°C까지는 추출 온도가 증가됨에 따라서 유지의 추출량이 증가되어 20°C에서는 71%, 30°C에서는 78%, 40°C에서는 85%, 50°C에서는 90%의 추출률을 보였으나 60°C에서는 58%로서 유지 추출물이 현저하게 감소되었다.

이러한 결과는 80°C 까지 추출 온도의 증가에 따라서 추출량이 증가되었으나 60°C이상에서는 추출 용매인

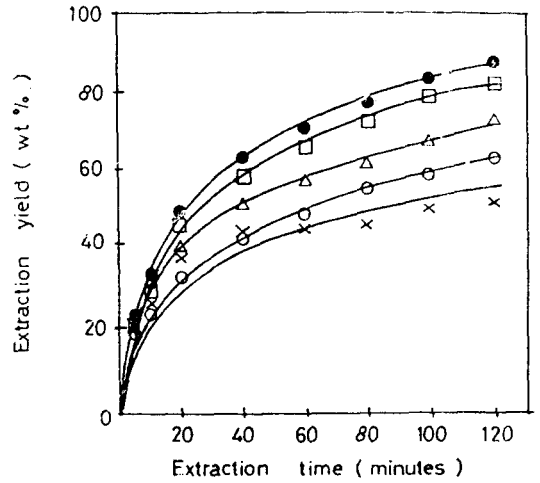


Fig. 3. Effect of temperature on the extraction of cellular lipid of *Rhodotorula rubra* YUFE 1526

— : theoretical
 Curve : experimental points
 ○—○ : 20°C △—△ : 30°C
 □—□ : 40°C ●—● : 50°C
 ×—× : 60°C

에틸알코올의 농도를 균일하게 유지하기가 힘들기 때문에 60°C를 인삼 성분의 최적 추출 온도로 결정하였다는 Ryu⁽⁷⁾의 인삼 성분의 추출 결과나 에틸알코올을 이용한 밤송이 색소의 추출 시 70°C까지는 추출 온도의 증가와 함께 색소의 추출량이 증대되었다는 Lee⁽⁴⁾의 결과들과는 차이가 있었다. 이는 인삼의 경우에서는

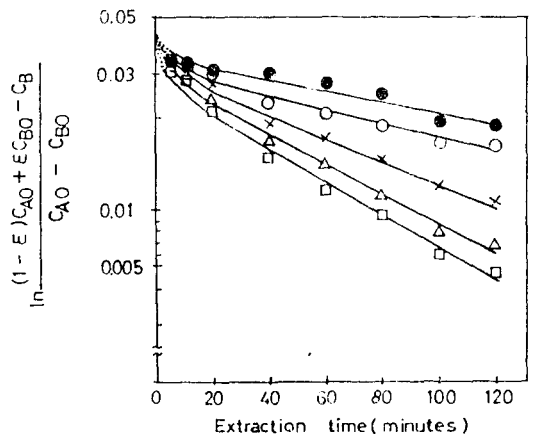


Fig. 4. $\ln \frac{(1-\epsilon)C_{AO} + \epsilon C_{BO} - C_B}{C_{AO} - C_{BO}}$ vs extraction time to the extraction temperature

○—○ : 20°C ×—× : 30°C
 △—△ : 40°C □—□ : 50°C
 ●—● : 60°C

Table 4. Bulk concentrations to the extraction temperature and extraction time

Ext. temp. (°C)	Bulk concentrations (C _B), wt %				
	20	30	40	50	60
Ext. time (min)					
5	0.0073	0.0083	0.0091	0.0099	0.0098
10	0.0091	0.0110	0.0128	0.0144	0.0140
20	0.0132	0.0165	0.0195	0.0208	0.0140
40	0.0195	0.0231	0.0254	0.0279	0.0185
60	0.0227	0.0264	0.0295	0.0314	0.0217
80	0.0259	0.0295	0.0325	0.0345	0.0221
100	0.0282	0.0321	0.0357	0.0373	0.0241
120	0.0306	0.0338	0.0368	0.0390	0.0252

1-ε=0.0431

50°C에서 환풍 건조한 것을 시료로 사용하였으며 밤송이의 경우에는 110°C에서 건조한 것을 시료로 사용하였다는 것과 시료가 지니고 있는 물성 차이로 생각되었으며 동시에 60°C에서의 추출률 저하는 균체에 변화가 일어나기 때문이라고 생각되었다.

추출 온도에 따른 유지의 확산도

추출 온도와 추출 시간의 변화에 따른 추출 용액내의 유지 농도(C_B)를 식 (13)으로 계산하면 Table 4와 같다.

Table 4의 C_B값을 사용하여 각 추출 온도에서의 $\ln \frac{(1-\epsilon)C_{AO} + \epsilon C_{BO} - C_B}{C_{AO} - C_{BO}}$ 와 t와의 관계를 도시하면 Fig. 4와 같다. 이때 얻어지는 직선의 기울기(m)로부터 각 추출 온도에 대한 균체 유지의 확산도 값을 계산한 결과를 Table 5에 표시하였다.

Table 5. Effect of extraction temperature on the diffusivity

Ext. temp. (°C)	20	30	40	50	60
Slope (×10 ⁻²)	0.6326	0.9025	1.2465	1.4967	0.4190
Diffusivity	3.9820	5.6811	7.8465	9.4089	2.6375

Diffusivity = ×10⁻⁹ mm²/min

Table 5에서 볼 수 있는 바와 같이 최적 추출 온도인 50°C에서의 균체 유지의 확산도는 9.4×10⁻⁹mm²/min으로서 이는 Ryu등^(7,8)의 60% 에틸알코올에서의 인삼 성분의 확산도 값(1.62×10⁻⁶cm²/min)이나 Namikawa등^(22,23)의 아미노산이나 saccharides의 확산도 값(0.38~0.80×10⁻⁶cm²/min), 대두를 tetrachloroethylene을 사용하여 추출할 때의 확산도 값(0.73×10⁻⁶ cm/sec)이나 어유의 확산도 값(0.96~1.17×10⁻⁷ cm/sec)⁽²⁴⁾에 비해서 매우 적은 값이었다. 이는 균체 유지의 추출 속도가 인삼 성분, 대두유, 어유등의 추

출 속도에 비해 느리다는 것을 보여준다고 하겠다. 한편 Table 5의 확산도 값을 식 (8)에 대입하여 추출 용매내의 유지 농도(C_B)를 구하면 이 C_B와 식 (13)으로부터 이론적인 추출률을 구할수 있으며 이의 결과를 Fig. 3에 실험치와 함께 나타내었다. Fig. 3에서 볼수 있는 바와 같이 유지 추출율에 대한 계산치(실선)와 실험치(점)의 값이 거의 일치함을 보여주었다.

Table 5의 추출 온도에 따른 균체 유지의 확산도 값을 각 추출 온도에 대해 도시하면 Fig. 5를 얻게 된다 Fig. 5에서 볼수 있는 바와 같이 추출 온도의 증가에 따른 균체 유지의 확산도 값은 반 대수 좌표상에서 직선 관계를 나타내었으며, 이러한 관계로 부터 추출 온도

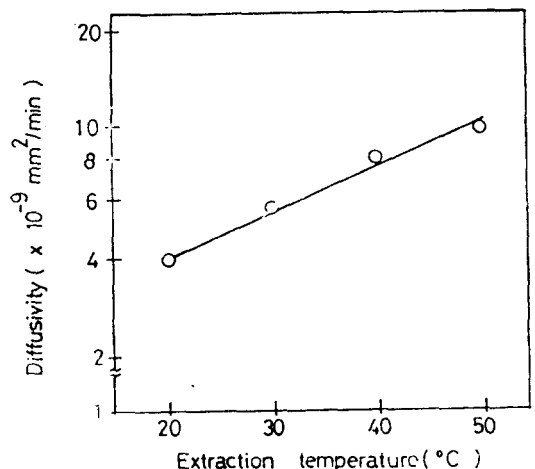


Fig. 5. Effect of extraction temperature on the diffusivity

에 따른 확산도 값(D)는 식 (15)와 같은 실험식으로 표시할 수 있다.

$$D = 2.2 e^{0.002807T} \times 10^{-9} \text{ (mm}^2\text{/min)} \dots \dots \dots (15)$$

단 20°C ≤ T ≤ 50°C

기 호 설 명

- C : Lipid concentration throughout the phase, w%.
- \bar{C} : Uniform concentration of lipid in the cell, w%.
- C_A : Lipid concentration in the cell, w%.
- C_{AO} : Uniform concentration of lipid throughout the cell, w%.
- C_B : Lipid concentration in the bulk solution, w%.
- C_{BO} : Uniform concentration of lipid throughout the bulk solution, w%.
- C_C : Cell concentration in the bulk solution, w/v%.
- C_E : Extraction yields, w%.
- C_R : Remaining lipid in the cell, w%.
- $\bar{C}_{(t)}$: Uniform concentration of lipid throughout the bulk solution at extraction time t , w%.
- D : Diffusivity, mm^2/min .
- m : Slope of straight line in the figure.
- n : Non-zero root of $\tan n = 3n/(3 + \alpha n^2)$.
- r : Optional distance in the cell, mm .
- R : Radius of cell, $2.5258 \times 10^{-3} mm$.
- t : Extraction time, min.
- T : Extraction temperature, $^{\circ}C$.
- V : Volume of solvent plus cell.
- W_E : Amounts of lipid in the bulk solution, g .
- W_O : Extractable total lipid in the cell, g .
- α : $\frac{1-\epsilon_1}{\epsilon}$ dimensionless.
- ϵ : Void volume, dimensionless.

요 약

미생물 균체로부터 유용 물질을 추출해 내는 機作을 조사하기 위하여 *Rhodotorula rubra* YUFE 1526의 냉동 건조 균체로부터의 균체 유지 추출을 통하여 고찰하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 균체 유지의 최적 추출 용매로는 메틸알코올이 적합하였으며, extractable total lipid의 량은 균체 량의 19.17 %이었다.
2. 교반 속도의 영향은 없었으며, 최적 추출 온도는 $50^{\circ}C$ 이었고, 2시간 동안의 추출에서 90 %의 추출물을 보였다.
3. 균체 유지의 확산도는 $50^{\circ}C$ 에서 $9.4 \times 10^{-9} mm^2/$

min로서 최대를 보였으며 추출 온도에 따른 확산도는 다음과 같았다.

$$D = 2.2 e^{00029017T} \times 10^{-9} mm^2/min$$

$$20^{\circ}C \leq T \leq 50^{\circ}C$$

4. 균체내의 유지 함유량이 변화되어도 확산도 값은 $9.4 \times 10^{-9} mm^2/min$ 로서 거의 일정하였다.
5. 추출 모델의 설정을 통해 구해진 이론식이 실험치와 거의 일치하고 있었다.

謝 意

이 연구를 위하여 후원하여 주신 사단 법인 한국 산학 협동 재단에 깊이 감사드립니다.

References

1. McCabe, W. L. and Smith, J. C. : *Unit Operation of Chemical Engineering*, 3rd Edd., p. 678~690, McGraw-Hill (1976)
2. Yu, J., Hong, Y. M., Yoo, S. K. and Kim, Y. S. : *Korean J. Food Sci. Technol.*, 9(1), 1 (1974)
3. Yu, J., Yoo, S. K. and Yang, R. : *Korean J. Food Sci. Technol.*, 7, 30 (1975)
4. Lee, S. W. : *A Study on the Extraction of Reddish-brown Pigment from Chestnut-bur*. M.D. Thesis, Yonsei University (1974)
5. Othmer, Donald F. and Agarwal, J. C. : *Chem. Eng. Prog.*, 51(8), 378 (1955)
6. Sakai, M. and Miki, M. : *J. Food Sci. Technol.*, (Japan), 22(5), 205 (1975)
7. Ryu, S. K. : *A Study on the Extraction of Ginseng Components*, pH. D. Thesis, Yonsei University (1978)
8. Ryu, S. K. Kim, W. S. and Yu, J. H. : *Korean J. Food Sci. Technol.*, 11(2), 118 (1979)
9. Park, I. S., Oh, D. H., Yang, R. and Yu, J. H. : *Yonsei Engineering Research*, 11, 75 (1979)
10. 柳洲鉉 等 : *食品 工學 實驗*, I, p. 384, 探究堂 (1977)
11. 柳洲鉉 等 : *食品 工業 實驗*, I, p. 533, 探究堂 (1977)
12. 柳洲鉉 等 : *食品 工學 實驗*, II, p. 596, 探究堂 (1977)
13. Bird, R. B., Stewart, W. E. and Lightfoot, E. N. : *Transport Phenomena*, Wiley International Ed., 357~360 (1960)
14. Folch, J., Lees, M. and SloaneStanley, G. H. : *J.*

- Biol. Chem.*, 226, 497 (1957)
15. Steinberg, M. P. and Ordal, Z. John : *Agric. Food Chem.*, 2(17), 873 (1954)
 16. Noble, A. C. and Duitschaever, C. L. : *Lipids*, 8 (11), 655 (1973)
 17. Ratledge, C. and Saxton, R. K. : *Anal. Biochem.*, 26, 288(1968)
 18. Sutherland, I. W. and Wilkinson, J. F. : *Methods in Microbiology* (4B), 345~383, Academic Press (1971)
 19. Hartman, L., Hawaka, J. C. Shorland, F. B. and di Menna, M. E. : *Arch. Biochim. Biophys.*, 81, 346 (1952)
 20. Swern : *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 3rd Ed., Interscience Publishers, p. 682 (1974)
 21. Woodbine, M. : *Industrial Microbiology*, 181~185.
 22. Namikawa, R. Okazaki, H. Nakanishi, K. Matsuno, R. and Kamikubo, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 41 (6), 1003 (1977)
 23. Nakanishi, K., Adachi, S., Yamamoto, S., Matsuno, R., Tanaka, A. and Kamikubo, T., : *Agric. Biol. Chem.*, 41(6), 2455 (1977)
 24. 食品 科學 便覽 : 共立 出版 株式 會社, p. 520~521 (1978)