

*Cellulomonas fimi*의 分離 및 同定, cellulase 特性和 톱밥의 Ethanol 轉換

李 燦 鏞 · 李 啓 瑚

서울대학교 農科大學 食品工學科

(1985년 5월 10일 수리)

Isolation and Identification of *Cellulomonas fimi*, Characteristics
of its Cellulase and Conversion of the Sawdust into Ethanol

Chan-yong Lee and Ke-Ho Lee

Dept. of Food Sci. and Technol., College of Agriculture, Seoul National University,
Suwon, Korea

Abstract

In the sheep and cattle's rumen, facultative anaerobic cellulolytic bacteria were isolated by using Hungate's roll tube technique. In the 21 isolated species, one was screened by its strong cellulolytic activity and identified as *Cellulomonas fimi* C-14 by investigate morphological, cultural, physiological characteristics and electron microgram.

Optimum conditions of the cell growth and enzyme production were pH 6.5 and 30°C, Thiamine and biotin support a good growth of *C. fimi* C-14. In the enzyme activities, Crystalline cellulose hydrolyzing activity, CMCase activity and β -glucosidase activity were 20.6, 226.6 and 0.56(unit $\times 10^3/ml$) at pH 6.0, 40°C.

By addition of fungal cellulase, enzyme activity was increased. Simultaneous Saccharification Fermentation is better than two step fermentation in ethanol yield with *Saccharomyces cerevisiae* DY 2.

緒 論

섬유질資源을 食糧과 Energy 源으로 轉換하기
위한 研究가 매우 활발하게 進行되고 있다.^{1,2,3)}
이 纖維質資源에는 Cellulose와 Hemicellulose,
그리고 分解가 어려운 lignin, 灰分등이 共存하고

있다.⁴⁾

이를 이용하기 위하여 Cellulose를 分解하는 酵
素의 성질과 그 기작에 대한 많은 보고가 있다.⁵⁻¹⁰⁾

Reese 등⁵⁾에 의해 *Trichoderma*屬 균주가 알
려진 이후 많은 Cellulase 生産 곰팡이에 대한 보
고가 있다.¹¹⁻¹⁴⁾ 그러나 곰팡이의 培養은 Bacteria
에 비해 많은 시간이 소요되며 固體培地에서 하여

아 하는 短點이 있으나 현재까지 알려진 바로는 곰팡이의 酵素力價가 細菌보다 더 높으므로, 보다 강력한 Cellulase를 생산하는 Bacteria 菌株를 찾으려는 많은 試圖가 이루어지고 있다.

예로부터, 반추동물의 제 1 胃인 Rumen 內에는 많은 종류의 섬유소分解細菌이 서식하리라고 생각하여 왔으며, Hungate^{16,17}, Bryant^{18,19}에 의하여 Rumen 으로부터 혐기적 纖維素分解細菌이 分離된 後로부터 이에 관한 研究가 활발히 發展되고 있다. 그 중에 Ruminococcus屬²⁰⁻²⁴), Clostridium²⁵⁻³⁰), Butyrivibrio³¹) 등 厭성혐기성細菌에 대한 많은 보고가 있으나 이들은 약간량의 산소에만 노출되어도 죽으므로, 그의 分離 및 培養, 취급이 어렵다.^{32,33}) 그러므로 취급이 용이하고, 培養할 때 aeration에 소요되는 動力이 절감되는 厭성혐기성細菌이 바람직하다.

厭성혐기성 섬유소分解細菌으로 Cellulomonas 가 甸양의 Rumen에서 Higuchi 등³⁴)에 의해, 토양에서 Han 등³⁵)에 의해 분리 보고되었으며 그外 Cellulomonas의 돌연변이주와 Gene transformation에 관한 연구보고가 있다.^{36,37})

한편, 纖維素의 분해율을 증가시키는 方法으로 Stenberg³⁸) 등은 β -glucosidase의 添加를, Freer^{39,40}) 등은 Cellobiose를 利用하는 Yeast를 동시에 培養하여 효소분해의 생산물인 Cellobiose의 축적에 의한 Feedback inhibition을 해제시킴으로서 더 높은 分解率을 얻을 수 있었다고 보고하였다. 많은 종류의 섬유소를 기질⁴¹⁻⁴⁵)로서 실험하였으나 대부분 곰팡이의 Cellulase를 使用한 것이며,

Bacteria를 利用한 研究로는 Enriquez⁴⁶) 등의 소수의 보고가 있을 뿐이다.

본 실험에서는 많은 種類의 纖維素分解細菌이 棲息하는 것으로 알려진 반추동물의 Rumen에서 厭성嫌氣性菌을 分離·同定하고, 분리균의 生育 및 酵素生産條件을 調査하였으며, 粗酵素의 特性과 β -glucosidase의 添加에 의한 分解率의 上昇效果를 알아보고, 酵母와의 혼합배양을 통하여, 톱밥을 醱酵처리하여 기질로 사용하여 이단계 발효법과 동시 당화 발효법(S.S.F.)에 의한 Ethanol 轉換을 시도하여 그 결과를 발표하고자 한다.

材料 및 方法

材 料

1. 菌分離源(Rumen)

서울대학교 농과대학 부속실험목장에서 飼育되고 있는 Rumen juice 採取用 甸양(♂, 45 kg)에서 Sampling 및 分離培地에 使用할 Rumen juice를 채취하였으며, 소의 Rumen juice는 농촌진흥청 축산시험장과 서울대학교 수의과대학에서 채취하였다.

2. 톱 밥

경기도 수원시 오목동 所在 山林廳 林木育種研究所에서 현사시나무를, 경기도 도척소재, 서울대학교 농과대학 부속中部研習林에서 잣나무를 얻어, Wiley-mill로 粉碎한 40~60mesh의 가루를 2-Naphthol을 첨가한 후 autohydrolysis하여

Table 1. Medium for isolation

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.06%
NaCl	0.6	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01
KH ₂ PO ₄	0.3	L-Cysteine·HCl	0.0
K ₂ HPO ₄	0.3	rumen fluid	5.0(V/V)
Cellobiose	0.2	CM Cellulose	1.0
Na ₂ CO ₃	0.4	Agar	1.5
Yeast extract	0.2	pH	6.8

Table 2. Omelianski modified medium

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.06
NaCl	0.6	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01
KH ₂ PO ₄	0.3	Yeast extract	0.2
K ₂ HPO ₄	0.3	CM cellulose	1.0
Agar	1.5	pH	6.8

Wise's method 로 脫리그닌한 holocellulose 를 Alcohol 전환실험의 기질로서 사용하였다.

方法

1. 섬유소 분해세균의分離

분리배지를 Hungate^{53,54}의 방법에 의해 roll tube 를 만들고 Rumen Sample 을 희석하여 주사기로 CO₂ gas flow 下에서 접종하고 CO₂ gas 를 채운 다음, 고무마개로 밀봉하여 Anaerobic jar (Oxoid 제)와 Anaerobic Incubator 에서 30°C 에서 7일간 배양하여 생긴 colony 를 사면배지에 이식하여 일차선발하였고 그 균주들의 filter paper 분해력으로 이차선발하였으며, 균주들이 생성하는 환원당을 DNS 法⁵⁵으로 정량하여 삼차선발하였다.

분리선발된 균주의 保存, 증식 및 효소생산을 위해서는 Omelianski modified liquid medium³⁴ 을 사용하였다.

2. 分離菌株의 同定

분리균주의 형태학적·배양학적·생리학적 성질들을 Skerman^{56,57}과 Manual of Method for General Bacteriology⁵⁷의 방법에 따라 조사하였고, 그 결과와 Bergey's Manual^{61,64} 등을 비교하여 同定하였다.

3. 粗酵素液 및 Fungal Cellulase 의 調製

30°C 에서 48 시간동안 진탕배양된 배양액을 9,000g 에서 4°C 에서 15 분간 원심분리한 상등액을 membrane filter 로 여과제균하여 4°C 에서 냉장보관하며 사용하였다.

Fungal Cellulase 는 *T. reesei* QM 9414 에서 분리, 동결건조한 분말효소 1g 을 0.05 M Citrate buffer (pH 5.5) 100 ml 에 녹여 4,500g 에서 4°C, 15 분간 원심분리한 상등액을 냉장보관하여 사용하였다.

4. 酵素力價의 측정

조효소의 역가를 C₁, C_x, β-glucosidase 로 나누어 기질을 microcrystalline cellulose,¹⁵ CMCel-lulose,⁶⁰ salicin⁵⁸ (2-hydroxymethyl-phenyl-β-D-glucoopyranoside)으로 사용하여 조효소를 작용시켜 생성되는 환원당을 比色정량하여 1분간에 1 μmole 의 생성물을 생산할 수 있는 효소의 역가를 1 unit 으로 하였다.

5. 톱밥분해물의 당류분석과 Alcohol 정량

탈리그닌처리한 시료 5g 을 phosphate buffer (pH 6.0)에 넣고 조효소액 5ml 를 넣고 30°C에서 24시간동안 진탕반응시킨 후 8,000 g 에서 10분간 원심분리하고 그 상등액을 다시 한의여과하여 HP LC 를 이용하여 당분석을 하였다.

HPLC는 Waters社 제품이었고, Carbohydrates 用 column(3.9mm ID×30cm)을 使用하였고, 전개용매는 Acetonitril 과 물을 80 : 20 으로 혼합하여 사용하였으며, flow rate 는 2ml/min, Attenuation 은 16 X, R 401 RI Detector 와 Waters 730 Data Module 을 사용하였으며, 이때 표준물질로서 xylose, mannose, glucose, arabinose, cellobiose 등을 사용하여 Retention time 와 Peak 면적들을 비교하여 정성 및 정량을 하였다.

Alcohol 정량은 Gas chromatograph 를 사용하여, Absolute Ethanol 희석액의 표준곡선을 구하여 Peak 의 높이를 비교하여 정량하였다.

이때 TRACOR GC 550 을 사용하였고 column 은 15% DEGS ON CHROMOSORB W.H.P. IN 1/4×6' GLASS COLUMN, Detector 는 FID at 280°C, Injector Temp 는 200°C, Column Temp 120°C, Attenuator : 10³×1, Recorder : JASCO RC-128 이때 chart speed 는 9.5cm/min 이었다.

6. 이단계 발효법과 동시당화발효법(S.S.F.)의 비교 및 곰팡이 Cellulase 첨가에 의한 상승효과

5g 의 현사시나무의 톱밥처리물을 phosphate buffer (pH 6.0) 85ml 에 넣고 조효소액 10ml, 또는 10ml 의 곰팡이 Cellulase 를 각각 넣고 또는 5 ml 씩 같이 넣어 24시간 반응시킨 후 가압살균하여 효모배양액 5 ml 를 넣어 30°C 에서 5일간 정치발효시켰다. (이단계발효법)

5g 의 현사시나무의 톱밥처리물을 포함한 buffer soln. 85ml 에 조효소액 5ml와 곰팡이효소액 5ml 를 넣고 동시에 효모의 전배양액 5ml를 넣어 30°C 에서 5일간 동시당화발효하였다.

結果 및 考察

1. 섬유소分解菌의 분리 및 선발

면양과 소의 Rumen 에서 21株의 통성 혐기성 섬유소 분해세균을 분리하였다.

Table 3. Cellulolytic activity of isolated m/o

Isolates	BA-1	FB-3	V-4	BJ-2	C-14	K-13	MJ-11
Crude cellulase activity	0.38	0.22	0.12	0.03	0.65	0.08	0.31

1 hr reaction, absorbance at 550 nm, pH 6.5

Table 4. Characteristics of the Isolate C-14 and *Cellulmonas* species

	Isolate	<i>C. flavigena</i>	<i>C. uda</i>	<i>C. fimi</i>
Morphological Characteristics				
Form	Irregular rod	Rod	Rod	Irregular rod
Size(μ m)	0.6~1.0×2.5	0.6~1.0×2.0	0.5~1.0×1.6	0.5~1.0×2.5
Motility	+	-	-	+
Gram staining	Variable	Variable	-	Variable
Culture Characteristics				
Agar slant	Yellow	Yellow	Gray white	Yellow or White
Broth	Uniformly turbid	Uniformly turbid	Uniformly turbid	Uniformly turbid
Gelatin liquefaction	+	+	+	+
Filter paper lysis	+	+	+	+
Colony				
Form	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevation	Convex	Convex	Convex	Convex
Margin	Entire	Entire	Entire	Entire
Physiological Characteristics				
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Litmus milk	Acid	Acid	Acid	Acid
Nitrate reduction	+	+	+	+
Methyl red	+	-	-	+
Indole	+	+	-	+
VP test	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+
NH ₃ production	-	-	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-

그중에 Filter paper 붕괴력 test를 하여 7株를 선발한 후 그의 조효소의 역가를 비교하여 가장 효소역가가 높은 균주 C-14을 선발하였다.

2. 분리균주의 同定

최종적으로 선발된 C-14의 형태학적·배양학적·생리학적 특성을 조사하였다. Hungate³²⁾에 의

하면 Rumen 안에 存在하고 Cellulose를 분해하는 간균(rod)은 모두 7가지의 種이 존재한다고 하는데 이 중에서 *Bacteroides succinogenes*⁶¹⁾는 배지중에 rumen fluid나 volatile fatty acids가 없으면 자라지 못하여, 많은 growth factor들을 요구하며, 생육적온이 40°C나 되므로 이 균은 분리균주와는 다르다. 또 *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellulosolvens*, *Clostridium lochheadii*, *Cillobacterium cellulosolvens*들은 모두 편성 혐기성(Strict Anaerobic)⁶²⁾들로서 분리균과는 관계가 없다.

Acetigenic Rod⁴²⁾는 gelatin 액화력, Indole 생성능력이 없고, Starch도 분해하지 못하며 litmus milk에서의 반응도 없으며, xylose, galactose, mannose 등을 발효하지 못하므로 역시 분리된 C-14과는 관계가 없다고 생각되어 분리균과 *Cellulomonas* 속 균주들의 특성^{63,64,65)}을 Table 4에서 비교하였다.

또 carbohydrates 이용성과 운동성의 유무, 그리

고 Bergey's manual 8판에서는 Bergey's manual 7판에 나와 있는 10종의 *Cellulomonas* 중의 7종을 *Cellulomonas flavigena*로 통합한다⁶⁴⁾고 한 보고 등을 종합하여 분리균 C-14을 *Cellulomonas fimi* C-14으로 同定하였다.

3. 菌生育의 最適條件

(1) 온도

30°C에서 생육과 Enzyme Activity가 최대이었고 35°C에서도 거의 같은 Growth와 Enzyme Activity를 보여주었다.

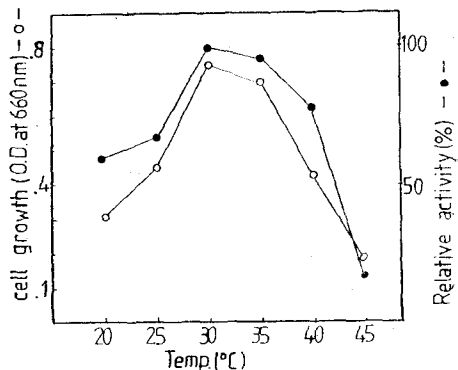


Fig. 1. Effect of temp. on the growth of *C. fimi* C-14 and activity of the crude enzyme

(2) 초기 pH

pH 6.5에서 생육과 효소역가가 최대이었고, 점도가 최소로 나타났다. 이때 cell growth에 의한 점도상승은 매우 작았다.

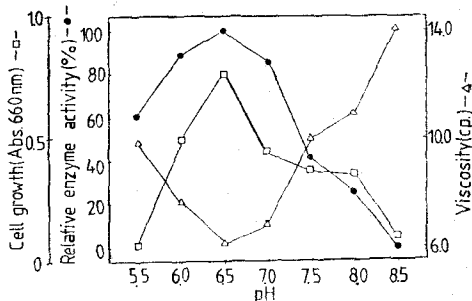


Fig. 2. Effect of pH on the growth of *Cellulomonas fimi* C-14, viscosity and on the activity of crude enzyme

4. 生育曲線(Growth curve)

48시간 배양시 효소의 분비가 가장 좋았으며 그 이후는 감소하였다.

Table 5. Carbohydrate Assimilation

	Isolate	<i>C. flavigena</i>	<i>C. uda</i>	<i>C. fimi</i>
Glucose	A	A	A	A
Fructose	A	A	A	A
Mannose	A	A	A	A
Arabinose	A	A	A	A
Galactose	A	A	A	A
Ribose	A	—	A	A
Xylose	A	A	A	A
Sorbose	—		A	—
Rhamnose	—	A	A	—
Maltose	A	A	A	A
Sucrose	A	A	A	A
Cellobiose	A	A	A	A
Lactose	A	A	A	A
Raffinose	—	A	A	
Trehalose	A			
Sorbitol	A	A	A	A
Mannitol	—	—	—	—
Inulin	—		A	—
Gycogen	A		A	A
Xylan	A	A		
Dextrin	A		A	A

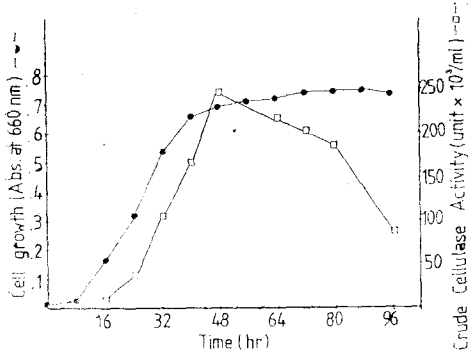


Fig. 3. Growth and activity of cell free cellulose of *Cellulomonas fimi* C-14 at pH 6.5, 30°C

5. 粗酵素의 特性

조효소의 효소역가를 C₁, C_x, β-glucosidase 로 나누어 측정할 결과, C₁ 과 β-glucosidase 의 Activity 는 40°C 에서 최대이었고, C_x Activity 는 45°C 에서 최대이었다.

초기 pH 에 따른 C₁, C_x, β-glucosidase 의 상대적 효소역가는 각각 pH 5.5, 6.5, 6.0 에서 최대이었다.

Cellulomonas fimi C-14 가 生産한 조효소의 역가를 측정할 결과 C₁, C_x, β-glucosidase 중에 β-glucosidase 의 역가가 낮아, Cellulose 분해산물의 대부분이 Cellobiose 로 축적되어 feed back Inhibition 을 할 뿐 만 아니라 Yeast 와의 혼합배양에 의한 Ethanol 발효생산시에 Yeast 가 이용하기 힘든 糖이 된다.⁶⁶⁾

이에 β-glucosidase 를 갖고 있는 곰팡이의 Cellulase 를 첨가한 결과 C₁, C_x 의 역가가 증가하였다. 이는 Stenberg^{33,67)} 등의 보고와 일치한다.

Table 6. Enzyme Activities of Fungal and crude cellulase (unit×10³/ml)

A : B(ml)	C ₁	C _x	β-glucosidase
1 : 0	20.6	227.6	0.56
0.5 : 0.5	43.55	550.8	13.8
0 : 1	48.8	666.6	26.6

A : Crude Cellulase,
B : Fungal cellulase at pH 6.0, 40°C

6. 톱밥酵素分解物의 糖類分析

전처리한 현사시나무의 톱밥을 C-14 의 조효소를 작용시켜 원심분리하여 얻은 상등액을 당분석

하였다.

이때 Retention Time 이 3.90 인 것은 xylose 또는 Mannose, 4.30 인 것은 glucose, 그리고 6.98 인 peak 는 cellobiose 이며 그 이후의 것들은 이들 보다 큰, 덜 분해된 것이다.

조효소의 역가에서 예측할 수 있듯이 분해물의 대부분이 cellobiose 로 축적됨을 보여준다.

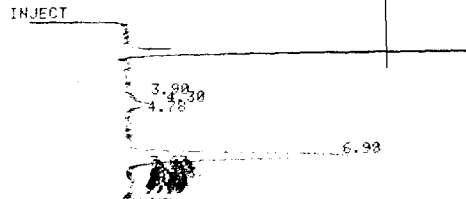


Fig. 4. HPLC Chromatogram for Enzymatic Hydrolysates of the Populus sawdust

7. 곰팡이 cellulase 첨가에 의한 상승효과와 이단계 발효법과 동시 당화 발효법(S.S.F.)의 비교

전처리한 현사시나무의 톱밥을 *C. fimi* C-14 의 조효소로 분해시키고 *S. cerevisiae* DY 2 를 접종하여 발효한 결과 당분석결과에서 본 바와 같이 효모가 이용할 수 있는 당인 glucose 는 소량이고, 대부분이 이용할 수 없는 cellobiose 이므로 생산된 Ethanol 은 매우 적었다. 곰팡이 cellulase 를 첨가한 결과 상승효과를 보였으며, 이단계 발효법보다 동시 당화 발효법(S.S.F.)의 Ethanol 생산이 높았다. 이는 Ghose⁶⁸⁾ 등의 결과와 일치한다.

Table 7. Synergistic effect by addition of Fungal cellulase and Comparison Two step Fermentation with S.S.F. in Ethanol Yield

Method	Enzymes	Ethanol Yield(v/v%)
Two-step	Crude cellulase	0.08
	Fungal cellulase	0.62
	Combination	1.05
S.S.F.	Combination	1.55

抄 錄

소와 양의 Rumen 에서 Hungate's roll tube 방법 에 의해 통성 혐기성 섬유소 분해세균을 분리하

였다. 가장 강한 섬유소 분해력을 갖는 균주를 선발하여 형태학적·배양학적·생리학적 특성 및 전자현미경사진을 검토하여 *Cellulomonas fimi* C-14으로 同定하였다.

분리된 *C. fimi* C-14의 균생육 및 효소생산은 30°C, pH 6.5에서 최대이었으며, 그의 粗酵素는 pH 6.0, 40°C에서 최대 역가를 보였으며 그 C₁, C_x, β-glucosidase의 Activity는 20.6, 227.6, 0.56 (unit×10³ml)이었다.

곰팡이 Cellulase의 첨가로 Enzyme Activity가 증가하였으며, 현사시나무의 톱밥을 기질로 하여, 분리균과 *S. cerevisiae* DY 2를 접종하여 Ethanol 발효생산시 β-glucosidase의 첨가로 상승효과를 보였으며, 이단계 발효법보다 동시 당화 발효법에 의한 Ethanol 생산이 더 좋았다.

참 고 문 헌

1. G.R. Wilke: Biotechnol. Bioeng. Symposium 5, 155(1976).
2. Roger, Y. Stanier: The microbial world 4th ed. Prentice-Hall INC., New Jersey 714~720(1976).
3. J.Goldenberg: Science 200 : 158(1978).
4. R.M. Vohra, C.K. Shirkot, S. Dhawan and K.G. Gupta: Biotech and Bioeng. 22 : 1497 (1680).
5. E.T. Reese: Appl. Microbiol. 4 : 39(1950).
6. G. Halliwell, M. Griffin: Biochem, J. 135 : 587(1973).
7. K.J. Nisizawa: J. Ferment. Technol. 51 : 267(1973).
8. T.M. Wood, S.I. Mccrae: Biochem. J. 128: 1183(1972)
9. L.G. Petterson, J. Porath: J. Biochem. Biophys. Acta. 67 : 6(1963).
10. D.Y. Rhu, S.B. Lee, I.H. Kim and H. Taguchi: Biotechnol. and Bioeng. 25 : 33(1981).
11. R. Ikeda, T. Yamamoto, M. Funatzu: Agri. Biol. Chem. 31 : 1201(1967).
12. S. Murao, J. Kanamoto, M. Arai: J. Ferment. Technol. 57 : 157(1979).
13. B.H. Kim, J.Y. Lee, M. Bae, S.K. Kim: Kor, J. Appl. Microbiol. Bioeng. 9 : 65(1981).
14. D.H. Chung: J. Kor. Agri. Chem. Soc. 14: 59(1971).
15. K. Nakamura, K. Kitamura: J. Ferment. Technol. 60 : 343(1982).
16. R.E. Hungate: Bacteriol. Rev. 14 : 1(1950),
17. R.E. Hungate: Can. J. Microbiol. 3 : 289 (1957).
18. M.P. Bryant: Bacteriol. Rev. 23 : 125(1959)
19. M.P. Bryant: J. Bacteriol. 64 : 325(1952).
20. M.J. Allison, M.P. Bryant, I. Katz, M. Kennedy: J. Bacteriol. 83 : 1084(1962).
21. B.A. Dehority: J. Bacteriol. 105 : 70(1971).
22. T.L. Miller, M.J. Wolin: J. Bacteriol. 116: 836(1973).
23. M. Taya, K. Ohmiya, T. Kobayashi: J. Ferment. Technol. 58 : 463(1980).
24. R.J. Stack, R.E. Hungate, and W.P. Opsahl: Appl. Environ. Microbiol., 46 : 539(1983).
25. David Brener, B.F. Johnson: Appl. Environ. Microbiol., 47 : 1126(1984).
26. M. Rahmatullah, A. Rahman, A.A. Chowdhury and M.A. Rashid: J. Ferment. Technol., 57 : 117(1979).
27. W.S. Park, Dewey D.Y. Rhu: J. Ferment. Technol., 61 : 563 : (1983).
28. N.J. Patni and J.K. Alexander: J. Bacteriol. 105 : 226(1971).
29. T.K.NG., J.G. Zeikus: Appl. Environ. Microbiol., 42 : 231(1981).
30. Nadia Ait, Nicole Creuzet, J. Cattaneo: J. Gen. Microbiol., 128 : 569(1982).
31. J.K. Alexander: J. Biol. chem., 243 : 2899 (1968).
32. R.E. Hungate: The rumen and its microbe. Academic Press. Inc. New York and London (1966).
33. Colin S. Stewart: Appl. Environ. Microbiol., 33 : 497(1977).
34. M. Higuchi, T. Uemura, C. Furusaka: J. Agr. Chem. Soc. Japan., 36 : 451(1962).
35. Y.W. Han, V.R. Srinivasan: Appl. Microbiol., 16 : 1140(1968).
36. J.M. Leatherwood, B.J. Stewart: J. Bacteriol., 128 : 609(1976).

37. N.R. Gilkes, D.G. Kilburn, M.L. Langsford, R.C. Miller, Jr, W.W. Wakarchuk, R.A.J. Warren, D.J. Whittle and W.K.R. Wong: J. Gen. Microbiol., 130 : 1377(1984).
38. D. Stenberg, P. Vijayakumar and E.T. Reese: Can. J. Microbiol., 23 : 139(1976).
39. S.N. Freer, R.W. Detroy: Biotechnol. and Bioeng., 25 : 541(1983).
40. V. Deshpande, H.S. Raman and M. Rao: Biotechnol. and Bioeng., 25 : 1679(1983).
41. B.H. Kim and M. Bae: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 7 : 91(1979).
42. B.H. Kim and J.W.T. Wimpenny: J. Ferment, Technol. 59 : 275(1981).
43. E.A. Kassim: J. Ferment. Technol., 60 : 381 (1982).
44. J.C. Cheong: J. Kor. For. Soc., 59 : 67(1983).
45. T.S. Cheong, D.S. Min: Kor. J., 38:13(1978).
46. Sung, C.G.: M.S. Thesis. S.N.U. (1981).
47. I.P. Chung, H.E. Kim, D.S. Min: Kor. For. J., 41 : 1(1979).
48. A. Enriquez: Biotechnol and Bioeng., 23 : 1423(1981).
49. D.S. Min: Kor. For. J., 39 : 57(1978).
50. Mikio Sato, Hajime Takahashi: Agr. Biol. Chem., 31 : 470(1967).
51. M.P. Bryant and L.A. Burkey: J. Dairy Sci., 36 : 205(1953).
52. J.M. Park: M. Sc. Thesis, Seoul Nat. Univ. (1984).
53. R.E. Hungate: Methods in Microbiology edited by J.R. Norris, D.W. Ribbons. New York: Academic. Vol. 3B p.117~132(1969).
54. Lillian, V. Holdman, W.E.C. Moore: The American J. of Clinical Nutrition 25 : 1314 (1972).
55. G.L. Miller: Anal. Chem., 31 : 426(1959).
56. V.B.D. Skerman: Abstracts of Microbiological Methods, John Wiley & Sons, New York (1969).
57. V.B.D. Skerman: A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2nd ed., the Williams and Wilkins, Baltimore(1967).
58. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester.: Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology. 411~442 (1981).
59. C.J. Kim: M. Sc. Thesis. S.N.U. (1982).
60. M.L. Langsford N.R. Gilkes, W.W. Wakarchuk, D.G. Kilburn, R.C. Miller, JR and R.A.J. Warren: J. Gen. Microbiol., 130 : 1367(1984).
61. L.V. Holdman, W.E.C. Moore: Bergey's Manual of Determine Bacteriology. 8th ed. the Williams and Wilkins, Baltimore(1974)
62. W.J. Loesche: Appl. Microbiol., 18 : 723 (1969).
63. M. Bae and B.H. Kim: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 2 : 1(1974).
64. Keddie, R.M.: Bergey's Manual of Determine Bacteriology. 8th ed. 629~631(1974)
65. B.H. Kim, J.W.T. Wimpenny: Can. J. Microbiol., 27 : 1260(1981).
66. W.W. Wakarchuk, D.G. Kilburn, R.C. Miller, JR and R.A.J. Warren: J. Gen. Microbiol., 130 : 1385(1984).
67. M. Mandel, J.E. Medeiros, Raymond E. Andreotti and Frank H. Bissett: Biotechnol and Bioeng., 23 : 2009(1981).
68. T.K. Ghose, R.D. Tyagi: Biotechnol. Bioeng. 21 : 1387(1979).