

## *Sporocytophaga congregata*에 의한 Cellulase 生産 및 그 酵素特性和 酵母와의 混合培養

金昌鎭 · 金尙淳\* · 李啓瑚

서울대학교 農科大學 食品工學科, \*淑明女子대학교 食品營養學科  
(1986년 2월 15일 수리)

### Production and Characteristics of Cellulase from *Sporocytophaga congregata* and Mixed Culture with Yeast

Chang-Jin Kim, Sang-Soon Kim\* and Ke-Ho Lee

Dept. of Food Science & Technology, College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, \*Sook Myung Woman's University, Seoul, Korea

#### Abstract

In order to produce cellulosic single cell protein from the cellulose, 163 strains of cellulose assimilating bacteria were isolated from 95 sources and one of them was screened by its strong cellulose assimilating activity, and was identified as *Sporocytophaga congregata* A-7. The optimum temperature and pH for cellulase production were 30°C and 6.0, and the optimum temperature, pH and heat stability of the enzyme were 50°C, 7.0 and below 55°C. When the bacteria was cultured in fermentor, the specific growth rate was 0.034hr<sup>-1</sup> and when the bacteria was mixed cultured with *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*, the specific growth rate of the bacteria and yeast were 0.06hr<sup>-1</sup> and 0.08hr<sup>-1</sup> respectively and total cell dry weight was 4~5g/l.

#### 緒 論

새로운 蛋白質資源의 개발을 목적으로 각종 발효기질을 利用한 미생물 菌體蛋白質 生産에 관한 연구보고가 많다. 이용가능한 발효기질 중에서 섬유소는 가장 중요하다고 하는데 이는年間 光合成에 의하여 生産되는 biomass(1,600억 t)의 1/3 (490억 t)정도를 섬유소가 차지하기 때문이다. 따라서 섬유질의 활용은 자원확보의 가능성을 보장

할 수 있는 유일한 활로라고 하겠다.

새로운 蛋白質資源으로서의 미생물은 고등생물에 비하여 세대시간이 극히 짧아 生産성이 높으므로 그 展望은 크다. 섬유소利用性 단세포蛋白質은 그 기질인 섬유소가 매년 식물체에 의하여 光合成되므로 資源은 무한히 풍부하다고 할 수 있다. 그러나 自然界에서 섬유소는 불용성인데<sup>1)</sup> 이는 lignin과 회분이 공존하고 있기 때문이며<sup>2,3)</sup>, 섬유소 糖化에 의한 糖生産費의 60%가 효소의 발효생산비로서<sup>4)</sup> 섬유소의 利用化에 큰 阻害要因이

되고 있다.

섬유소를 分解資化할 수 있는 미생물 및 이들의 섬유소 분해효소에 관하여는 絲狀菌이 많이 알려져 있으며 특히 *Trichoderma*屬에 관한 연구가 많다. 細菌類에서는 *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Cellvibrio*, *Clostridium*, *Acetivibrio*屬 및 방선균인 *Thermonospora*, *Streptomyces*屬 등이 알려져 있다.

본 실험에서는 섬유소 資化細菌을 分離, 同定하고, 分離된 섬유소 資化細菌에 의한 cellulase 生産 조건 및 효소특성을 조사하고, 이러한 결과를 이용하여 단세포 蛋白質 生産을 도모하고자 섬유소 기질에 *Sporocytophaga congregata*와 효모의 혼합배양을 시도하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試菌株

전국에서 수집한 썩은나무, 퇴비, 토양 등 95점의 試料에서 채취한 163株의 섬유소 資化菌株 및 서울大學校 食品工學科에 보관중인 *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*<sup>5)</sup>를 사용하였다.

### 2. 섬유소 資化細菌의 분리 및 선발

1) 菌分離 및 1次選抜: 수집된 95점의 균분리원 試料의 현탁액을 균분리용 배지((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, NaCl 5g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, CaCl<sub>2</sub> 0.1g, yeast extract 1g, proteose peptone 1g, distilled water 1l, pH 7.0)에 탄소원으로 carboxymethyl-cellulose와 microcrystalline-cellulose를 0.5% 첨가한 고체배지에 plating하고 30°C에서 3~4일간 배양한 후 성장속도가 빠른 colony를 취한 다음 순수분리하였다.

2) 2次選抜: 균분리용 배지에 filter paper (Whatman No. 1, 1×6cm)를 탄소원으로 하여 1차선발한 균주를 접종하고 배양한 후 filter paper 붕괴력이 우수한 균주를 선발하였다.

3) 3次選抜: Carboxymethyl-cellulose와 microcrystalline-cellulose 0.5%를 탄소원으로 하는 균분리용 배지 30ml를 250ml 삼각 flask에 넣고 2차선발된 균주를 접종하여 48시간 진탕배양한 후 원심분리한 상등액을 조효소액으로 하여 0.5% carboxymethyl-cellulose 용액을 기질로 50°C에서 30분간 반응시켜서 생성된 환원당량을 DNS 方法<sup>6)</sup>으로 측정하고 cellulase 효소활성이 높은 균주

를 선발하였다.

### 3. 섬유소 資化細菌의 同定

균체의 형태 및 크기, Gram 염색, 당에 대한 대사작용등은 상법<sup>7)</sup>으로 관찰하였고 편모에 의한 운동성, microcyst, gelatin액화, 최저온도 및 pH, colony 형태등은 Shibata 등의 방법<sup>8)</sup>에 따라 관찰하였으며 gliding motility등은 Skerman의 방법<sup>9)</sup>에 따라 관찰하였다.

### 4. 紫外線 照射에 의한 변이주 선발

분리선발한 *Sporocytophaga congregata* A-7 균주보다 섬유소 資化能이 우수한 변이주를 선발하기 위하여 TGY배지 (tryptone 5g, glucose 1g, yeast extract 2.5g, pH 7.0)에서 菌株을 배양한 후 원심분리하고 생리식염수로 2회 세척하고 4×10<sup>6</sup> cells/ml 정도가 되도록 희석하여 20~60초간 자외선을 조사(2,080erg/mm<sup>2</sup>)하였다. 이를 균분리용배지에 적당량을 plating하고 나타난 큰 colony를 순수분리하고 2, 3차 선발시와 동일한 방법으로 효소활성이 높은 변이주를 선발하였다.

### 5. 菌生育 및 효소생산조건 검토

배양온도를 15~40°C로, 배양액의 초기 pH를 5.5~8.0으로 조절하여 菌生育 및 효소생산조건을 비교하였고 탄소원의 종류 및 농도를 달리하여 효소활성을 측정하고 또한 삼각 flask 및 microferm. 조건에서 배양시간에 따른 菌生育 및 효소의 활성을 조사하였다. 삼각 flask 실험은 80시간 까지, 진탕배양하면서 8시간마다 균생육 및 효소활성을 측정하였고 microferm. 실험은 5l 용 fermentor (NBS MF-114)를 사용하여 working volume 2l, 통기 1vvm, 교반 500rpm, 온도 30°C, 초기 pH 6.0 조건에서, 24시간 전배양된 배양액을 3% 접종하고 배양하여 4시간 마다 균생육정도, 효소활성, 배양액중의 환원당량을 측정하였으며 antifoumer로서 AZ-20R을 사용하였다.

### 6. 배양액의 分析

효소활성은 1% carboxymethyl-cellulose 용액 (phosphate buffer pH 7.0) 0.5ml를 기질로 하고 조효소액 0.5ml와 50°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 측정하여 mg/ml로 표시하였고<sup>6)</sup> 균생육정도는 660nm에서 흡광도를 측정하거나 hemacytometer로 균수를 직접 측정하였다.

7. 조효소의 特性

효소작용의 최적온도, 최적 pH 및 효소의 열에 대한 안정성정도를 조사하기 위하여 각 조건에서 효소활성을 측정하고 비교하여 相對活性으로 나타내었다<sup>10)</sup>.

8. 混合培養을 위한 효모의 選定

섬유소資化細菌과 효모를 混合培養함으로써 섬유소資化細菌에 의해 배양액중에 生成된 glucose 등을 효모가 利用케 하여 product inhibition<sup>11,12)</sup>을 최대한으로 줄여 더 많은 菌體를 生産할 수 있게 考하였다.

본 실험에서는 選발한 섬유소 資化細菌과 함께 *Candida guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* var. *guilliermondii*, *Tolulopsis candida* 를 각각 균분리용배지 50ml 에 접종하여 24, 48시간동안 진탕배양하여 菌生育을 비교하고 混合培養에 적합한 효모를 選定하였다.

9. 酵母와의 混合培養

5l jar fermentor 를 이용하여 균분리용배지(탄소원: carboxymethyl-cellulose+microcrystalline-cellulose 2%농도) 2l에 섬유소資化細菌과 선

정된 효모를 starter로 진배양액 3%씩을 접종하고 5와 같은 조건하에서 배양하여 6시간마다 菌生育 및 배양액중의 환원당량을 측정하였다.

結果 및 考察

1. 섬유소 資化細菌의 分離

95점의 썩은나무, 퇴비, 토양등의 시료에서 163 株의 섬유소資化細菌을 분리하고 filter paper 붕괴력이 우수한 35株를 2차選별하고 이 중에서 효소활성이 우수한 A-7 菌株를 최종 選발하였다.

2. 섬유소 資化細菌의 同定

알카리성 토양에서 분리한 A-7 菌株의 形態學的 및 培養學的 특징은 Table 1과 같이 gliding motility를 가지며 spherical type의 microcyst를 형성하였다. 또한 生理學的 특징은 Table 2와 같다. 즉 nitrate를 환원시키며 H<sub>2</sub>S를 생성치 않았다. 또한 糖자화성은 Table 3과 같이 starch를 이용하였다.

Bergey's manual<sup>13)</sup>에는 *Sporocytophaga*屬 細菌의 분류학상의 특징이 거의 나타나 있지 않으나 Akashi와 Ueda 등의 보고<sup>14,15)</sup>와 비교하여 선

Table 1. Morphological and cultural characteristics of selected strain A-7

| Isolate A-7                   | <i>Sporocytophaga ellipsospora</i> | <i>Sporocytophaga myxococcoides</i> | <i>Sporocytophaga ochracea</i> | <i>Sporocytophaga congregata</i> |
|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Morphological characteristics |                                    |                                     |                                |                                  |
| Form                          | rod                                | rod                                 | rod                            | rod                              |
| Size(μ)                       | 0.5×5                              | 0.5×2.5                             | 0.3~0.5×5~8                    | 0.5~0.8×5~12                     |
| Motility                      | gliding                            | gliding                             | gliding                        | gliding                          |
| Gram staining                 | —                                  | —                                   | —                              | —                                |
| Microcyst                     | spherical (1.5)                    | ellipsoidal (0.3×1.3)               | spherical (1.5)                | spherical (0.5~0.9)              |
| Cultural characteristics      |                                    |                                     |                                |                                  |
| Agar slant                    | white                              | white                               | light brown                    | pale yellow                      |
| Broth                         | pellicle                           | pellicle                            |                                | pellicle                         |
| Gelatin liquefaction          | +                                  | +                                   |                                |                                  |
| Colony                        |                                    |                                     |                                |                                  |
| Form                          | circular                           | circular                            | circular                       | circular                         |
| Elevation                     | raised                             | raised                              | fiat to concave                | flat to concave                  |
| Margin                        | entire                             | entire                              | entire                         | entire                           |

**Table 2.** Physiological characteristics of selected strain A-7

| Isolate A-7                                    | <i>Sporocytophaga ellipsospora</i> | <i>Sporocytophaga myxococcoides</i> | <i>Sporocytophaga ochracea</i> | <i>Sporocytophaga congregata</i> |
|--|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Starch hydrolysis                              | ±                                  | -                                   | -                              | -                                |
| Nitrate reduction                              | +                                  | +                                   | +(-)                           | +                                |
| Fermentative or oxidative break down of sugars | ferm.                              | ferm.                               | ferm.                          |                                  |
| Indole production                              | -                                  | -                                   | -                              | -                                |
| Ammonia production                             | +                                  | +                                   | +(-)                           | +                                |
| H <sub>2</sub> S                               | -                                  | +                                   | -                              | +                                |
| M.R. test                                      | +                                  | +                                   |                                |                                  |
| V.P. test                                      | +                                  | +                                   |                                |                                  |
| Catalase                                       | +                                  | +                                   | +                              | w                                |

**Table 3.** Carbohydrate assimilation of selected strain A-7

| Isolate A-7 | <i>Sporocytophaga ellipsospora</i> | <i>Sporocytophaga myxococcoides</i> | <i>Sporocytophaga ochracea</i> | <i>Sporocytophaga congregata</i> |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Glucose     | A                                  | A                                   | A                              |                                  |
| Fructose    | A                                  | A                                   |                                |                                  |
| Arabinose   | A                                  | A                                   |                                |                                  |
| Xylose      | -                                  | -                                   |                                |                                  |
| Raffinose   | A                                  | A                                   |                                |                                  |
| Inulin      | A                                  |                                     |                                |                                  |
| Maltose     | A                                  |                                     |                                |                                  |
| Cellobiose  | A                                  | A                                   |                                |                                  |
| Galactose   | -                                  | -                                   |                                |                                  |
| Sucrose     | A                                  | A                                   |                                |                                  |
| Lactose     | A                                  | A                                   |                                |                                  |
| Mannitol    | A                                  | -                                   |                                |                                  |
| Ribose      | A                                  | A                                   |                                |                                  |
| Sorbitol    | -                                  | ±                                   |                                |                                  |
| Mannose     | A                                  | A                                   |                                |                                  |
| Dextrin     | A                                  |                                     |                                |                                  |
| Glycerol    | A                                  |                                     |                                |                                  |
| Starch      | A                                  |                                     | -                              | - A                              |

A : assimilation

발균주를 *Sporocytophaga congregata* A-7 으로 同定하였다.

과 60'-2균주가 가장 우수하여 이후의 실험에는 60'-2 균주를 사용하였다.

### 3. 紫外線 照射에 의한 변이주 선발

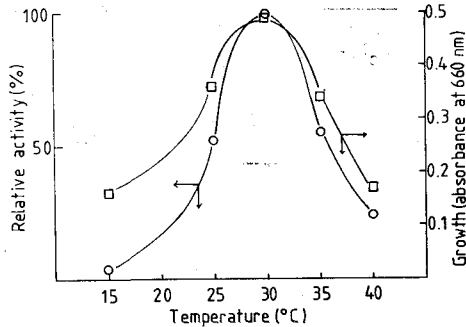
紫外線 照射에 의해 변이주들을 얻고 이들의 효소활성을 비교하여 Table 4 에 나타내었다. 그 결

### 4. 菌生育 및 효소생산조건

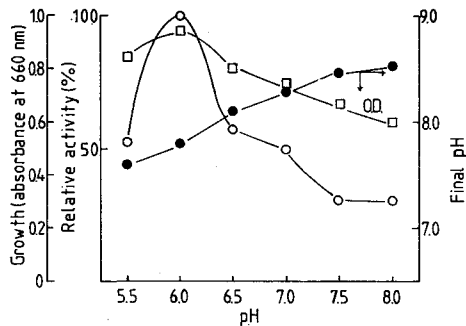
60'-2 菌株의 배양온도에 따른 菌生育 및 효소생산은 Fig. 1 과 같이 30°C 에서 가장 높았으며

**Table 4.** Cellulolytic activity of mutants

| Strains | Terminal pH | Reducing sugar (mg/ml) | Relative activity (%) |
|---------|-------------|------------------------|-----------------------|
| A-7     | 8.56        | 1.19                   | 100                   |
| 20'-1-2 | 8.39        | 1.36                   | 102                   |
| 60-1    | 8.37        | 1.38                   | 108                   |
| 60'-2   | 8.46        | 1.41                   | 113                   |
| CH-D    | 8.45        | 1.29                   | 89                    |
| 20'-1-1 | 8.66        | 1.27                   | 79                    |
| CH-F    | 8.75        | 1.16                   | 102                   |
| 40'-3-2 | 8.88        | 1.19                   | 85                    |
| 50'-3-1 | 8.85        | 1.03                   | 72                    |



**Fig. 1.** Effect of temperature on the growth of *S. congregata* 60'-2 and the activity of the extracellular cellulase.



**Fig. 2.** Effect of pH on the growth of *S. congregata* 60'-2 and the activity of the extracellular cellulase (○—○ enzyme activity, ●—● final pH, □—□ cell growth).

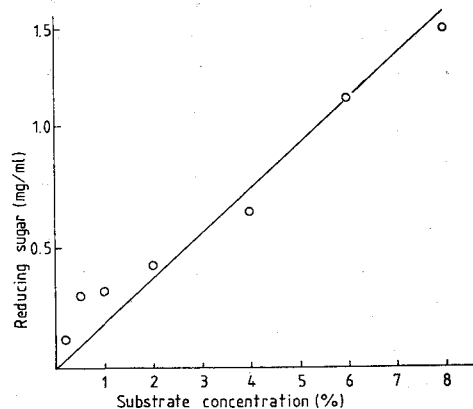
배지의 초기 pH를 달리한 실험결과는 Fig. 2와 같이 pH 6.0에서 가장 菌生育과 효소생산이 높았다.

탄소원의 종류에 따른 효소활성을 비교하기 위하여 각 탄소원의 농도를 1%로 하여 실험한 결과는 Table 5와 같다.

**Table 5.** Effect of carbon sources on cellulase production

| Carbon sources added (1%)      | Cellulase activity (%) |
|--------------------------------|------------------------|
| CMC                            | 49                     |
| Filter paper                   | 0                      |
| Microcrystalline cellulose     | 34                     |
| Absorbent cotton               | 11                     |
| Xylan                          | 205                    |
| Fibrous filter paper           | 20                     |
| Walseth cellulose              | 16                     |
| Soluble starch                 | 176                    |
| CMC+filter paper               | 34                     |
| CMC+microcrystalline cellulose | 100                    |

그 결과 Murao 등<sup>16)</sup>의 보고와 같이 xylan, soluble starch에서 효소활성이 높았으나 섬유소 利用目的에 합리적이어야 하므로 carboxymethyl-cellulose+microcrystalline-cellulose가 최적탄소원이었다. 또한 탄소원농도를 0.2~8%로 하여 효소활성을 비교한 결과는 Fig. 3과 같이 계속 직선적으로 증가하였다.



**Fig. 3.** Effect of C-source(CMC+microcrystalline cellulose) concentration on the activity of the extracellular cellulase.

삼각 flask 배양실험에서 경시적으로 菌生育 및 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 8시간 이후에 균생육이 급격히 증가하였고 효소활성은

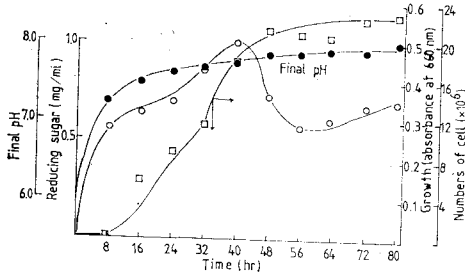


Fig. 4. Growth and activity of extracellular cellulase of *S.congregata* 60'-2 at 30°C, pH 6.0, 120strokes/min, C-source 1% (○-○ enzyme activity, ●-● final pH, □-□ cell growth).

배양초기부터 증가하여 40시간 정도 후에 최고에 도달하였다. Specific growth rate( $\mu$ )는  $0.033hr^{-1}$ 로 나타났다.

또한 microferm 실험의 결과는 Fig. 5와 같이 菌生育은 초기 16시간까지 거의 없다가 그 후 48시간까지 급격히 증가하여  $\mu=0.034hr^{-1}$ 이었다. 또한 효소활성은 32시간에 최대로 높았으며 그 이후에는 조금 감소하는 경향을 보였다.

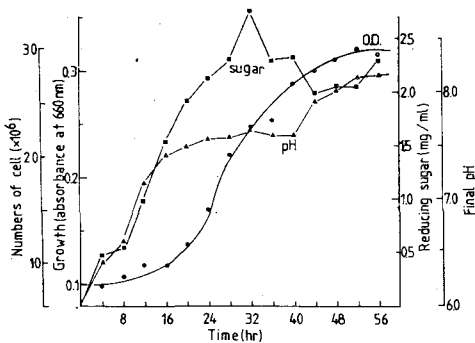


Fig. 5. Growth and reducing sugar in culture filtrate at 30°C, pH 6.0, 500 rpm, 1vvm, C-source conc. 2%, antifoaming agent (AZ-20R) 0.01%.

### 5. 조효소의 特性

배양 최적조건에서 48시간 배양한 배양 상등액을 조효소액으로 하여 효소특성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 6과 같이 pH 7.0, 50°C에서 효소활성이 가장 높았으며 열안정성을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 그 결과 55°C까지는 비교적 안정함을 나타내었다.

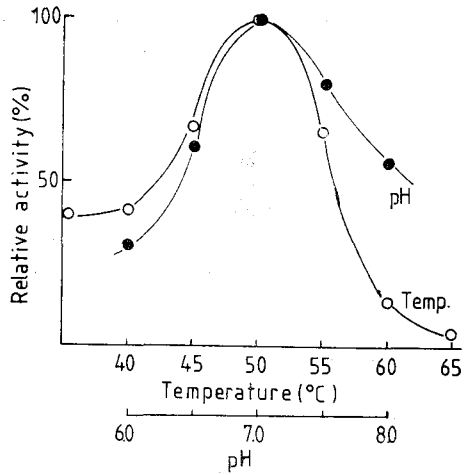


Fig. 6. Effect of temperature and pH on the activity of crude cellulase from *S. congregata* 60'-2.

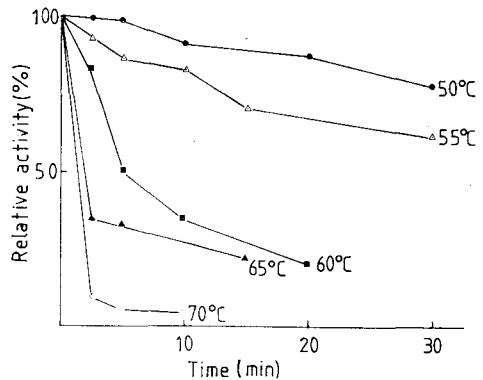


Fig. 7. Thermal stability of crude cellulase.

### 6. 混合培養을 위한 효모의 選定

선발된 *Sporocytophaga congregata* 60'-2 菌株와 효모를 混合培養하여 24, 48시간후의 菌生育 정도를 Table 6에 나타내었다.

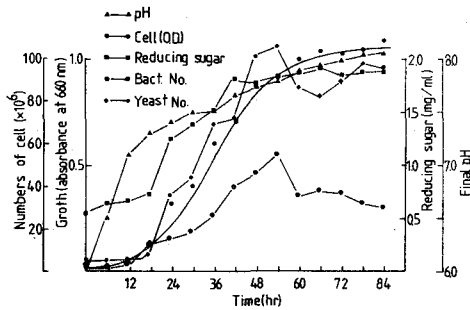
그 결과 본 연구실에서 분리 동정한 바 있는 xylose 資化性 효모인 *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*<sup>5)</sup>가 가장 적합하였으며, 섬유소 資化細菌이 生育中 배양액의 pH를 증가시키는데 반해 효모의 경우는 生育中 배양액의 pH를 감소시키므로써 混合培養에서 pH 상쇄효과를 기대하였으나 단독배양에 비해 큰 효과는 없는 것 같았다.

**Table 6.** Yeast screening for mixed culture with *S. congregata* 60'-2 (yeast cell no./bacteria cell no.)

|                                  |      | <i>C. guilliermondii</i> var. <i>guilliermondii</i> | <i>Candida tropicalis</i> | <i>C. guilliermondii</i> | <i>Tolulopsis candida</i> |
|----------------------------------|------|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Cell number<br>( $\times 10^6$ ) | 24hr | 144/30  | 44/40                     | 150/38                   | 18/12                     |
|                                  | 48hr | 170/28  | 42/20                     | 150/30                   | 20/20                     |
| Cell O.D.<br>(660nm)             | 24hr | 0.96  | 0.65                      | 0.92                     | 0.56                      |
|                                  | 48hr | 1.09  | 0.67                      | 0.85                     | 0.59                      |
| Final<br>pH                      | 24hr | 7.6   | 7.7                       | 7.5                      | 7.4                       |
|                                  | 48hr | 7.6   | 7.6                       | 7.6                      | 7.4                       |

**7. 混合培養**

선발한 *Sporocytophaga congregata* 60'-2 菌株와 *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* 를 혼합배양하고 세균과 효모의 生育과 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 8 과 같다.



**Fig. 8.** Growth and reducing sugar in culture filtrate during mixed culture at 30°C, pH6.0, 500rpm, 1vvm, C-source conc. 2%, antifoaming agent(AZ-20R) 0.01%.

그 결과 초기 18시간까지는 菌生育이 거의 없다가 60시간까지 급격히 증가하여 세균의 경우는  $\mu=0.063hr^{-1}$  이었고 효모는  $\mu=0.08hr^{-1}$ 로 나타나 세균의 경우 단독배양시 specific growth rate  $0.034hr^{-1}$ 에 비해 2배정도 증가하였다. 48시간 배양후의 菌體生産량은 건조량으로 약 4~5g/l 였으며 앞으로 천연섬유소나 농산폐자원등의 천연기질로서 균체생산을 위한 배지로 사용하기 위하여는 더욱 연구가 계속되어야 하겠다.

**抄 錄**

섬유소로부터 섬유소이용성 단세포단백질을 생

産하기 위하여 전국에서 수집한 95점의 試料로부터 163株의 섬유소資化細菌을 분리하고 이들 중 섬유소資化力이 강한 1株를 選定하고 *Sporocytophaga congregata* A-7으로 同定하였다. 최적 菌生産 및 효소생산의 조건은 온도 30°C, 초기 pH 6.0 이었으며 효소반응의 최적조건은 온도 50°C, pH 7.0 이었고 효소의 열안정성은 55°C이었다. 선발된 섬유소資化細菌과의 混合培養에 적합한 효모로는 *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* 가 選定되었으며 混合培養時 specific growth rate는 효모의 경우  $0.08hr^{-1}$  이고 細菌의 경우는  $0.063hr^{-1}$ 로서 細菌 단독배양시의  $0.034hr^{-1}$ 에 비해 2배로 증가하였으며 48시간 배양후의 균체조건량은 약 4~5g/l 정도이었다.

**參 考 文 獻**

1. M. Tanaka, M. Taniguchi, T. Morita, R. Matsuno and T.Kamikubo: J. of Ferment. Technol., 57 : 186~190(1979).
2. R.M.Vohra, C. K.Shirkot, S. Dhawan and K.G. Gupta: Biotech. and Bioeng., 22 : 1497~1500(1980).
3. Deschamps, A.M., Mahoudeau, G. and Lebeault, M.M.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 9 : 45(1980).
4. Wilke, G.R., Yang, R.D. and Stockar, U.: Biotech. and Bioeng. Symp. 6 : 155(1976).
5. 鄭圭玉: 서울大學校 大學院 食品工學科 碩士學位論文(1982).
6. G.L. Miller: Anal. Chem., 31: 426~428 (1959).

7. Society of American Bacteriologists: Manual of Microbiological Methods, McGraw-Hill, New York(1957).
8. Shibata, Y. and K. Nisizawa: J. Ferment. Technol., 47 : 573(1969).
9. Skerman, V.B.D: A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2nd ed., the Williams and Wilkins, Baltimore (1967).
10. 오대광 : 서울대학교 大學院 碩士學位論文 (1982).
11. M. Katz, and E.T. Teese: Appl. Microbiol., 16 : 419~420(1968).
12. T.K.Ghose and T.A. Kostick: Biotech. and Bioeng., 12 : 921~946(1970).
13. Breed, R.S., Murry, E.G.D. and Smith, N. R.: Bergey's Manual of Determination Bacteriology, 8th ed., the Williams and Wilkins, Baltimore(1974).
14. Akashi, A.: J. Agri. Chem. Soc. Jap., 34 : 895~900(1962).
15. Ueda, K., S. Ishikawa, T. Itami and T. Asai: J. Agri. Chem. Soc. Jap., 25 : 543~549(1952).
16. S.Murao, J.Kanamoto and M.Arai: J. Ferment. Technol., 57 : (1979).