

Cellulose 分解 방선균의 分離 및 同定

정현호 · 성하진* · 최용진* · 양한철

고려대학교 농과대학 유전공학과* 식품공학과
(1986년 9월 1일 수리)

Isolation and identification of cellulolytic Actinomycetes

Hyun-Ho Jung, * Ha-Jin Sung, *Yong-Gin Choi and Han-Chul Yang

*Department of Genetic Engineering, Department of Food Technology,
College of Agriculture, Korea University, Seoul, Korea
(Received September 1, 1986)

About 300 cellulolytic actinomycetes isolated from soils were tested for their cellulase activities estimated by means of filter paper swelling and carboxymethyl cellulose saccharifying activity. Then, 16 isolates which had shown relatively high levels of CMCase activity were selected and examined for their abilities of β -glucosidase production. Among them strain No. 109 was found to have highest level of intracellular β -glucosidase, and selected for the further studies. In this paper, the cultural, morphological and physiological properties, and cell wall composition of strain No. 109 were described in relation to the taxonomic status of this actinomycete. Based on the results obtained in these experiments strain No. 109 was identified to be a similar species to *Streptomyces tanashiensis*.

섬유소는 지구상에 가장 널리 그리고 가장 풍부하게 존재하고 있는 잠재식량 및 에너지 자원이라고 할 수 있겠다⁽¹⁾. 그러나 섬유소는 화학적 내지는 생물학적 가수분해에 매우 저항성이 큰 견고한 구조를 지닌 화합물이기 때문에 현재로서는 극히 일부분만이 이용되고 있을 뿐이다^(2,3). Cellulase를 이용한 생물학적 가수분해 방법은 화학적 방법에 비해 많은 장점을 가지고 있으나 반응속도도 늦고 분해율이 극히 낮을 뿐만 아니라^(4,5) 효소생산 비용이 매우 높아 섬유소 자원이용에 가장 큰 저해요인이 되고 있다⁽⁶⁾. 따라서 높은 분해력을 가진 cellulase를 경제적으로 다량 생산함은 섬유소 자원의 적극적 이용을 위한 매우 중요한 과제라고 하겠다.

Cellulase는 일반적으로 미생물로부터 얻어지고 있으며 생산 미생물의 종류에 따라 다소간 차이가 있을 수 있으나 대부분의 경우 endo- β -D-glucanase (E. C. 3. 2. 1. 4), exo- β -D-glucanase (E. C. 3. 2. 1. 91) 및 β -glucosidase (E. C. 3. 2. 1. 21) 등으로 구성되어 있는 효소 복합체인 것이다^(7,8). Cellulase를 생산하는 미생물은 *Trichoderma* 속을 비롯한 각종 곰팡이^(9,10), *Clostridium* 속등의 세균^(11,12), *Sacc-*

haromyces 속등의 효모⁽¹³⁾ 및 *Thermomonospora* 속등의 방선균등의⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ 많은 종류의 미생물이 보고되고 있으나 실제 공업적 생산에 이용되고 있는 균종은 *Trichoderma* 속이 대표적이라 하겠다. 그러나 *Trichoderma* 속의 곰팡이가 생산하는 cellulase는 β -glucosidase의 활성 부족이 큰 단점으로 지적되고 있고⁽¹⁷⁾ 또 최신 유전자조작 기술적용에 있어서 곰팡이보다는 방선균이 훨씬 유리하다고 판단되어 본 연구에서는 cellulase 생산균을 방선균으로 한정하며 특히 β -glucosidase 활성이 우수한 균주를 토양으로부터 분리하여 일차로 분리 방선균의 동정 시험을 실시, 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Cellulose 분해 방선균의 분리

본 실험에 사용한 균주는 전국 20 여지역의 퇴비, 썩은 나무, 엽류등을 포함한 토양 시료에서 다음과 같은 2 단계 선별과정을 거쳐 얻은 토양 분리방선균이다. 즉, glucose-asparagine 배지 (glucose 10g, asparagine 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, agar 15g, pH 6.8

중류수 1000ml)에서 30°C, 4 일간 배양한 토양분리균의 colony 형태를 관찰, 방선균이라고 판단되는 균주를 분리하고 분리방선균은 C. M. C. 10g, KH₂-PO₄ 2g, NaCl 3g, KNO₃ 3g, yeast extract 1g, MgSO₄·7H₂O 0.50g, FeSO₄·7H₂O 0.02g, MnSO₄·H₂O 0.01g, CaCl₂·2H₂O 0.40g, pH 7.2, 중류수 1000 ml 로 구성되어 있는 분리용 배지에 접종, 30°C에서 48 시간 진탕배양하여 얻은 조효소액의 carboxymethyl cellulase (C. M. C) 활성을 측정하여 일차 선별하였다.

상기 일차 선별균을 동일조건에서 배양하여 균체내 β-glucosidase 활성을 조사하여 이차 선별하였다.

효소활성 측정

조효소액의 조제: 분리용 배지에서 30°C, 48시간 진탕배양시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액을 CM-Case 조효소액으로 사용하였다. 그리고 동일배양 조건에서 얻은 균체를 phosphate buffer (0.05M, pH 6.5) 로 세척한 다음, 초음파처리를 하여 균체를 파괴한 다음 원심분리하여 얻은 상등액을 β-glucosidase 활성측정의 조효소액으로 사용하였다.

Carboxymethyl cellulase 활성 측정: Miller, G. L 등의 방법⁽¹⁸⁾에 따라 효소반응을 시킨 다음 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson 방법⁽¹⁹⁾으로 정량함으로써 CMCase 활성을 측정하였다.

β-glucosidase 활성 측정: 1% salicin 용액을 기질로 하여 40°C에서 60분 반응시켜 이때 유리되어 나오는 환원당을 Somogyi-Nelson 법으로 분석하여 균체내 β-glucosidase의 활성을 측정하였다.

단백질 정량 조효소액의 단백질 정량은 Lowry 방법⁽²⁰⁾을 이용 하였다.

배양 및 형태적 특성조사

배양기상의 특징: Colony 성장, 성장상태, 기균사의 색, 뒷면의 색 및 가용성색소 생성등의 배양상의 특징은 International Streptomyces Project (I-SP) system에 준하여 배양 7일, 14일 및 21일째 조사 관찰하였다.

형태적 특징: 기균사와 기생균사의 특징은 Giolitti와 Bentani의 셀로판법⁽²¹⁾에 따라 관찰하였으며 포자형태는 임계점 건조방법을⁽²²⁻²³⁾ 이용 표본제작을 하여 주사형 전자현미경 (Hitachi model Hu-11E-1)을 사용하여 검경하였다.

생리적 특성조사: 공시균의 일반적인 생리적 특성조사는 방선균의 동정실험법⁽²⁴⁾, manual of methods for general bacteriology⁽²⁵⁾ 및 미생물의 분류와 동정⁽²⁶⁾ 등에 따라 실시하였으며 항생물질 감

수성 시험은 都와 俞등⁽²⁷⁾의 방법에 따랐다.

세포벽 구성성분 분석

Whole cell을 사용한 2,6-diaminopimelic acid

및 당분석: Staneck와 Roberts⁽²⁸⁾의 방법에 따라 2,6-diaminopimelic acid 분석은 건조균체 3 mg을 6N-HCl로 가수분해하고 박층크로마토그래피에 의해 분리하였다. 한편 당성분은 건조균체 25 mg을 1N-H₂SO₄로 가수분해하고 종이크로마토그래피를 이용, 분석하였다.

세포벽의 아미노산 분석: 長谷川등⁽²⁹⁾의 방법에 따라 일차 세포벽을 분리 정제하고 정제세포벽 5mg을 6N-HCl로 가수분해한 다음 박층크로마토그래피에 의해 아미노산 분석을 행하였다.

분리균의 동정

분리균의 동정은 주로 Bergey's manual of determinative bacteriology⁽³⁰⁾, Shirling과 Gottlieb의 방법⁽³¹⁾, David Berd의 방법⁽³²⁾, M. P. Lechevalier & H. Lechevalier의 방법⁽³³⁾, 및 방선균의 동정실험법⁽²⁴⁾ 등을 참고하여 동정하였다.

Table 1. Cellulase activity of Actinomycetes isolated from soils.

Strain No.	CMCase Activity (Red. Sugar; O. D.)	Filter Paper Act. (Swelling Factor)	β-Glucosidase Activity (units/mg)
6	0.65 × 5		None
58	0.47 × 5	+	None
61	1.40 × 5	+	2.76
64	0.86 × 5	++	2.16
65	0.95 × 5		0.95
71	0.99 × 5		4.37
73	1.10 × 5	+	None
93	0.52 × 5	+++	2.21
106	1.32 × 5		3.75
109	1.24 × 5		10.19
198	0.82 × 5		None
205	0.75 × 5		1.27
206	0.74 × 5		6.35
208	0.46 × 5		None
220	0.66 × 5	+	2.74
285	0.41 × 5		5.72

+ : Degree of filter paper swelling.

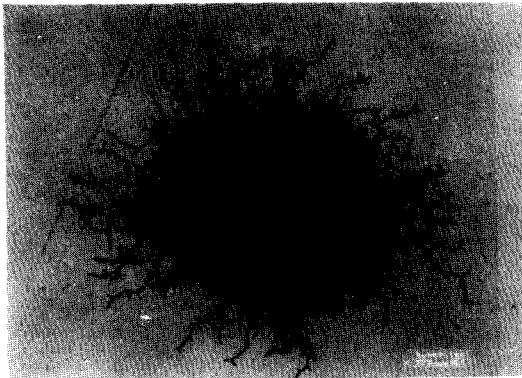


Fig. 1. Morphology of substrate mycelium of strain No. 109 (The strain was grown on glucose asparagine agar at 30°C for 8hrs; × 100)

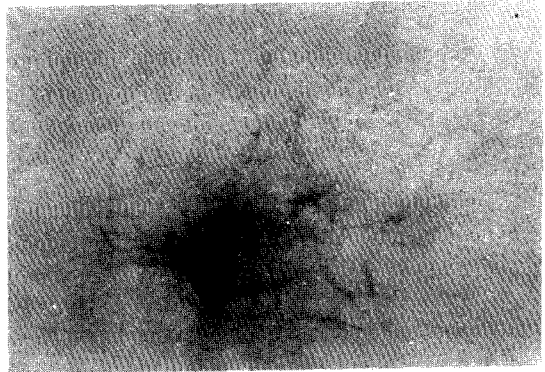


Fig. 2. Photomicrograph of aerial mycelium of strain No. 109 (The strain was grown on glucose asparagine agar at 30°C. for 48hrs; × 250)

결과 및 고찰

시험균의 분리

일반세균이 자라기 어려운 glucose-asparagine 배지에서 30°C, 4 일간 배양한 토양분리균 중에서 colony 형태로 판단, 방선균이라고 생각되는 약 300 여 균주를 분리하고 이들 균주를 분리용 배지에서 48 시간 배양하여 CMCase 생산능이 높은 16 균주를 일차로 선별하였다 (Table 1 참조).

상기 일차선별 균주중에서 β-glucosidase 생산능이 가장 높았던 No. 109 분리균을 본 연구의 시험균주로 최종선별하여 아래와 같이 균주동정을 실시하였다.

No. 109 균주의 미생물학적 특성

배양 및 형태적 특성

배양기상의 특징 : 14일간 전배양한 공시균을 각 배지에 접종, 배양하면서 colony 성장, 성장, 기균사의 색, 뒷면의 색, 가용성색소 등을 관찰한 결과 colony 성장은 배지에 따라 다양한 형태였으며 성장은 yeast. ex. -malt ex. agar, bennet agar, yeast ex. agar, salts starch agar, oatmeal agar 등에서는 잘 생육했으나 sucrose nitrate agar (Czapek's) 에서는 생육이 미약하였다.

Shirling과 Gottlieb의 방법에 따라 yeast ex. -malt ex. agar, oatmeal agar, salts-starch agar, glycerol asparagine agar 배지등에서 기균사의 색이 회색으로 뒷면의 색이 연한황색으로 나타났으며 가용성색소는 생성하지 않았다. 한편 glucose asparagine agar 에서는 배양 14 일차에 황색에서 회색으로, tyrosine agar 에서는 21 일차에 황색에서 회색으로 변색되어 다른 배지에서는와는 다른 특이한 결과를 보였다.

형태적 특징 : No. 109 균주의 세포관법에 의한 검경결과 기생균 사는 배양 8 시간때 잘 발달하였으나 기균사는 48 시간 배양했을 때 처음으로 나타나기 시작하였다 (Fig. 1과 Fig. 2 참조) 기균사 형태는 rectiflexibles 이라고 분류할 수 있었으며 glucose asparagine 배지에서 엷은 흑색으로 나타났다.

한편 임계점 건조방법에 따른 포자형태는 Fig. 3 과 같이 smooth type로 분류되었다.

생리적 특성

No. 109 균주는 Gram 양성 of 생육 pH 범위가 pH 6 ~ 11이며 최적 pH는 7.2 이고 30°C 의 최적온도를 나타내는 중온성 및 호기성인 방선균으로서 열저항성도 양성을 나타내었다. 기타 중요생리시험 결과는 아래와 같다.

내염성

염농도가 3 %까지는 왕성하게 잘 생육 하였으나 4 %에서는 상당한 생육저해를 보였으며 그 이상의



Fig. 3. Electron photomicrograph of spores of strain No. 109 (The strain was grown on bennet agar at 30°C for 10 days; × 10000)

염농도에서는 전혀 생육하지 못하였다.

Melanine 색소 생성

I. S. P system 에 준해 각종배지에서 공시균을 배양하면서 색소생성 관계를 관찰한 결과 tyrosine agar 에서는 색소생성을 하지 않았으나 peptone-yeast-iron-agar 에서는 엷은 흑색을 그리고 trypton yeast 액체배지에서는 갈색색소를 생성하였다.

탄수화물 이용성

Pridham & Gottlieb⁽³⁴⁾ 의 기초배지를 사용해서 당 이용성을 검토한 결과 D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-galactose, cellobiose, Na-citrate 등은 잘 이용했으며 D-fructose, salicin, trehalose 등은 약간 이용했을 뿐이고 L-rhamnose, raffinose, mannitol, i-inositol, sucrose, phenol, ethanol 등은 전혀 이용하지 못했으며 특히 No. 109 균주는 그 형태로 보아서 *Nocardia* 속의 균주와 유사했으나 No-

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of strain No. 109.

Factor	Characteristics
Oxygen requirement	Positive
Gram staining	Positive
Catalase production	Positive
Optimum temperature	30 °C
Optimum pH	7.2
NaCl tolerance	4 % ≥
Decomposition of cellulose	Positive
Hydrolysis of esculin	Positive
Hydrolysis of tween 80	Positive
Melanine pigment	Positive or negative
H ₂ S production	Positive
Acid from carbohydrate	Negative
Hydrolysis of starch	Positive
Hydrolysis of gelatin	Positive
Coagulation of milk	Positive
Hydrolysis of casein	Positive
Decomposition of xantine, hypoxanthine, tyrosine	Positive
Urease production	Positive
Lysozyme resistance	Slightly sensitive
Streptomycin susceptibility	Sensitive (5µg/ml)
Penicillin susceptibility	Not sensitive (200 µg/ml)
DNase production	Negative
Indole production	Negative
Nitrate reduction	Positive

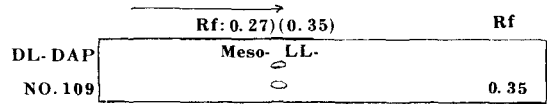


Fig. 4. Separation of whole cell DAP isomers by Thin Layer Chromatography. (It was carried out by ascending technique using a Chroma-gram Eastman Kodak No. 6064 Cellulose, Methanol: H₂O: 6N-HCL: Pyridine (80:26:4:10) and Ninhydrin)

cardia 속의 균주들이 자화한다고 하는 paraffin 을 본균은 이용하지 못하였다.

탄수화물로부터 산생성

각종 탄수화물을 첨가한 무기질소 한천배지에서 산생성을 검토한 결과 D-glucose, maltose, mannose, trehalose, dextrin, xylose 등에서는 극히 미약한 반응을 보였으며 fructose, galactose, arabinose, rhamnose, inositol, mannitol, sorbitol, lactose 등을 첨가한 배지에서는 전혀 산생성을 하지 않아 본 시험균은 산생성을 하지 못하는 것으로 판단되었다.

Gelatin 액화

Glucose-peptone-gelatin 배지에서 20 °C 및 30 °C, 21일간 천자배양하면서 젤라틴액화 상태를 관찰한 결과 7 일차에 약간 액화하기 시작해서 21 일차에는 흑갈색 색소를 생성하면서 특히 표면에는 액화가 거의 완전한 것으로 보아 젤라틴액화에 있어서 양성을 나타내는 호기성균임을 확인하였다.

우유응고

Litmus 우유를 저온간헐살균 후 무균검사를 거친 다음 시험균을 접종, 30 °C, 14일간 배양하면서 우유응고 상태를 관찰한 결과 배양 3 일차에 응고가 일어나기 시작해서 10 일차에는 투명한 유청을 생성하는 것으로 보아 우유응고가 일어남을 알 수 있었다. 그러나 대다수의 *Streptomyces* 속의 균주는 효소에 의해 우유응고를 일으킨다고 하나 본 시험균인 No. 109 균주는 산에 의한 응고인지 효소에 의한 응고인지 확인하지 못했다.

Xanthine, hypoxanthine, tyrosine의 분해: Xanthine, hypoxanthine과 tyrosine이 함유된 각각의 배지에서 30 °C, 21일간 배양하면서 상기 화합물의 분해 정도를 관찰한 결과 xanthine agar에서 배양 3 일차부터 미약하게 분해해서 21 일차에는 투명대의 직경이 약 2 cm 정도였으나 hypoxanthine agar 에서는 3 일차에 1.8 cm 정도의 투명대가 생성되었으며 21 일차에는 직경이 약 4.5 cm 까지 확대되었다. 한편, tyrosine agar 에서는 1 일차부터 분해하기 시작해서 14 일차에 2 cm, 21 일차에는 3 cm 정도의 투명대가 생

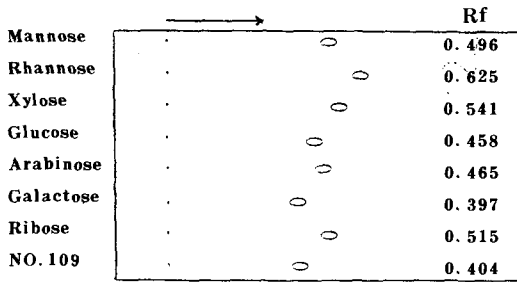


Fig. 5. Separation of whole cell carbohydrates by Paper Chromatography. (It was carried out by ascending technique using a Whatman No. 3. paper n-Butanol: H₂O: Pyridine: Toluene(10: 6: 1) and Aniline phthalic reagent.)

성되었다. 따라서 본 시험균인 No. 109 균주는 hypoxanthine을 가장 잘 분해하였고 다음 tyrosine, xanthine순서로 분해함을 알 수 있었다.

Lysozyme내성

Lysozyme을 첨가한 glycerol 액체배지에서 30°C, 28일간 배양하면서 lysozyme내성을 조사한 결과 배양 7일째부터 lysozyme을 첨가하지 않은 대조구와 생육의 차이를 보이기 시작해서 14일째는 현저한 생육저해현상을 확인할 수 있었으며 pellet 형성 특성에도 변화를 일으켜 lysozyme첨가 배양액에 pellet을 형성하지 않고 다소 혼탁되었다.

항생물질 감수성

Glucose asparagine 액체배지에 penicillin 및 streptomycin을 0~200µg/ml 첨가하여 30°C, 14일간 배양하면서 그 생육도를 조사한 결과 penicillin 200µg/ml까지는 거의 영향을 받지 않고 잘 생육하였으나 streptomycin의 경우는 3일차부터 첨가하지 않는 대조구와는 분명한 생육의 차이를 보이면서 14일차에는 5µg/ml첨가 액체배지에서도 생육이 현저한 저해를 나타내었다.

이상의 생리시험 결과와 기타 H₂S 생성, 진분 및 casein 가수분해, urease생산, 질산염환원, indole생성 및 DNase생산등의 시험결과를 종합하면 Table 2와 같다.

세포벽 구성성분 분석

2, 6-diaminopimelic acid 분석: Whole cell를 가수분해시킨 후 TLC에 전개시킨 결과 Fig. 4와 같이 Rf:0.35의 위치에서 LL-DAP를 확인하였으며 이 점적은 발색 직후에는 진한 녹색에서 시간이 경과함에 따라 황색으로 변화였다.

당성분 분석: 종이크로마토그래피에 의한 당성분 분석 결과는 Fig. 5에 나타난 것과 같다. 표준물질

의 경우 5탄당은 발색, 6탄당은 황색으로 나타나서 쉽게 구분된다. 시료물질은 Rf:0.4 부근에서 미지의 황색 점적이 나타났을 뿐 다른 어떤 특정한 당성분을 확인할 수 없었다.

아미노산 분석: 정제세포벽을 가수분해 시킨후 TLC를 이용, 아미노산을 분석한 결과 Fig.6과 같이 핑크색의 alanine(Rf:0.53)과 glutamic acid(Rf:0.45)가 검출됨으로써 No. 109 균주가 방선균임을 입증해주었으며 황색의 glycine(Rf:0.43)도 검출되어 세포벽 type I임을 확인할 수 있었다.

균주동정

No. 109 균주는 형태적 특성, 특히 smooth type의 포자형성, 기생균사 및 기균사 형성 등으로 보아 전형적인 *Streptomyces*속임을 알 수 있었다. 또한 탄수화물로부터 산생능이 없을 뿐만아니라 Berd. D의 *Streptomyces*속의 중요 동정기준이 되고 있는 호기성, casein 및 xanthine분해에 대한 양성등의 생리적 특성으로 보아 *Streptomyces* 속임을 확인하였다.

한편, 세포벽 구성성분 분석 결과에 의하면 No. 109 균주는 방선균 세포벽 주요 구성성분포^(30,33)에서 LL-DAP와 glycine을 함유한 세포벽 type I, 그리고 특정한 당성분을 가지고 있지 않는 당 type C로 분류되었다. 이와 같은 세포벽 조성을 나타내는 균종으로는 *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Microellobosporia*, 및 *Sporichthya* 속등⁽²⁴⁾이 있으나 이들은 형태적 특성에서 서로 뚜렷한 차이를 나타냄으로써 쉽게 식별할 수 있다. 따라서 No. 109 균주는 세포벽 성분분석 결과로서도 *Streptomyces* 속임을 재확인할 수 있었다.

나아가서 Czapek's 배지에서 미약한 생육⁽³⁰⁾, yeast malt agar, oatmeal agar, salts starch agar, 및 glycerol asparagine agar 등의 배지에서 회색의 기균사 형성과 연한황색의 기생균사 형성등의 배양상의 특징⁽³¹⁾과 당이용성⁽³¹⁾, melanine색소⁽³¹⁾ 생성, H₂S 생성⁽³⁵⁾ 및 *Streptomycin*에 대한 감수성⁽³⁰⁾ 등

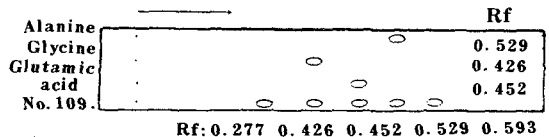


Fig. 6. Separation of cell-wall amino acid by Thin Layer Chromatography. (It was carried out by ascending technique using a Silicagel 60 F 254. Merck Art 5735, Methanol: Pyridine: 10 N-HCl: H₂O(80: 10: 2.5: 18.5) and Ninhydrin.)

Table 3. Comparison of major characteristics of *S. tanashiensis* with those of strain No. 109.

Factor		<i>Streptomyces tanashiensis</i>	Strain No. 109
Growth: ;	Czapek's agar	Poor growth	Poor growth
Aerial mass color;	Yeast ex. malt ex. agar	grey	grey
	Oatmeal agar	grey	grey
	Salts starch agar	grey	grey
	Glycerol asparagine agar	grey	grey
Reverse side color;	Yeast ex. malt ex. agar	Pale yellow	Pale yellow
	Oatmeal agar	Pale yellow	Pale yellow
	Salts starch agar	Pale yellow	Pale yellow
	Glycerol asparagine agar	Pale yellow	Pale yellow
Soluble pigment;	Yeast ex. malt ex. agar	None	None
	Oatmeal agar	None	None
	Salts starch agar	None	None
	Glycerol asparagine agar	None	None
Melanine pigment;	Tyrosine agar	None	None
	Peptone yeast iron agar	Pale black	Pale black
	Trypton yeast broth	Brown	Brown
Spore surface		Smooth type	Smooth type
Spore chain		Rectiflexibiles	Rectiflexibiles
NaCl tolerance		4% \geq , but 7% <	4% \geq
H ₂ S production		Positive	Positive
Streptomycin susceptibility		Sensitive	Sensitive (5 μ g/ml)
Utilization of carbon compound	+ : Utilized	+- : Slightly - : Not utilized	
	D-glucose	+	+
	D-xylose	+	+
	L-arabinose	+	+
	L-rhamnose	-	-
	D-fructose	+-	+-
	raffinose	-	-
	mannitol	-	-
	i-inositol	-	-
	sucrose	-	-
Oxygen requirement		Positive	Positive
Hydrolysis of casein		Positive	Positive
Decomposition of xanthine		Positive	Positive
Cell-wall composition; amino acid		細胞壁 type I	LL-DAP, glycine
sugar		糖 type C	No characteristic sugar pattern

의 중요 생리적 특성이 *Streptomyces*속 중에서 *tanashiensis*와 완전 일치하고 있으며 단지 내염성에 있어서 *S. tanashiensis*가 4% \geq ~ < 7%로 보고⁽³⁰⁾되고 있으나 본시험균은 \geq 4%의 내염성을 나타내는 약간의 차이를 제외하고는 Table 3에 표시되어

있는 바와 같이 기타 대부분의 형태적 및 생리적 특성이 *S. tanashiensis*와 가장 유사함으로 No. 109균주는 *S. tanashiensis* 또는 그 유연군으로 동정하였다.

요 약

토양으로부터 carboxymethyl cellulase 및 intra-cellular β -glucosidase 생산능력이 높은 방선균 No. 109 균주를 분리하고 이 균주의 배양상 내지는 형태적 특성, 생리적 특성 그리고 세포벽 구성성분 등을 조사, 균동정을 행한 결과 No. 109 분리균은 *Streptomyces tanashiensis* 또는 그 유연균으로 동정되었다.

참고문헌

1. 竹内均, 長谷川洋作 地球生態学 エネルギー物質의循環と人間活動 다이아몬드社 東京 (1975)
2. Esau, K.: Plant Anatomy JOHN WILEY & SONS N.Y., 2nd ed. (1965)
3. Cowling, E.B. and T.K. Kirk: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **6**, 95-123 (1976)
4. Grethlein, H.E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 503-525 (1978)
5. 田中三男 : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 145-155 (1980)
6. Wilkie, C.R., R.D. Yang and U.V. Stockar: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **6**, 155-175 (1976)
7. Reed, G.: *Enzymes in Food Processing*, Academic Press Co., 2nd ed. New York (1975)
8. Reese, E.T., R.G.H. Siu and H.S. Levinson: *J. Bacteriol.*, **59**, 485-497 (1950)
9. Tangnu, S.K., H.W. Blanch and C.R. Wilke: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1837-1849 (1981)
10. Parry, J.B., J.C. Stewart and Heptinstall: *J. Biochem.*, **213**, 437-444 (1983)
11. Johnson, E.A., M. Sakajoh, G. Halliwell, A. Madia and A.L. Demain: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**(5) 1125-1132 (1982)
12. Stoppok, W., P. Papp and F. Wagner: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**(1) 44-53 (1982)
13. Detroy, R.W., R.L. Cunningham, R.J. Bothast, M.O. Bagby and A. Herman: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1105-1115 (1982)
14. Ishaque, M. and D. Kluepfel: *Can. J. Microbiol.* **26**, 183-189 (1980)
15. Morera, A.R., J.A. Phillips and A.E. Humphrey: *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1339-1347 (1981)
16. Malfait, M., B. Godden and M.J. Penninckx: *Ann. Microbiol. (Paris)*, **135B-1**, 79-89 (1984)
17. Bailey, W.J.: *Biotechnol. Letters*, **3-12**, 695-700 (1981)
18. Miller, G.L., R. Blum, W. Glennon and A.L. Burton: *Analy. Biochem.*, **2**, 127-132 (1960)
19. Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
20. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
21. Giolitti, G. and M. Bentani: *J. Bacteriol.*, **65**, 281-282 (1952)
22. 田中敬一, 永谷隆: 図説走査電子顯微鏡 朝倉書店 (1980)
23. Dietz, A. and J. Mathews: *Appl. Microbiol.*, **21**(3) 527-533 (1971)
24. 清野昭雄: 放線菌의 同定實驗法, 日本放線菌研究会編 (1985)
25. Manual of Methods for General Bacteriology, ASM (1981)
26. 長谷川武治: 微生物의 分類と同定 (下), 学会出版センター 東京 (1984)
27. 都在浩, 金相達: *Kor. J. Appl. Microbiol.*, **10** (4) 237-243 (1982)
28. Stanek, J.L. and G.D. Roberts: *Appl. Microbiol.*, **28**(2) 226-231 (1974)
29. 駒形和男: 微生物의 化学分類實驗法, 学会出版センター 東京 (1982)
30. Buchaman, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, The Williams Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. 8th ed. (1974)
31. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Intern. J. System Bacteriol.*, **18**(4) 279-392 (1968)
32. Berd, D.: *Appl. Microbiol.*, **25**(4) 665-681 (1973)
33. Lechevalier, M.P. and H. Lechevalier: *Intern. J. System Bacteriol.*, **20**(4) 435-443 (1970)
34. Pridham, T.G. and D. Gottlieb: *J. Bacteriol.*, **56**, 107-114 (1948)
35. Tresner, H.D. and F. Danga: *J. Bacteriol.*, **76**, 239-244 (1958)