

Brevibacterium lipolyticum 변이주에 의한 1,4-Androstadiene-3,17-Dione 의 생성

최인화·이강만

이화여자대학교 약학대학

(Received November 23, 1989)

Production of 1,4-Androstadiene-3,17-dione by a Mutant Strain of *Brevibacterium lipolyticum*

In Wha Choi and Kang Man Lee

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract—Microbiological conversion of sterols to 17-ketosteroids has been recognized as a source for commercial preparation of steroidal drugs. In order to develop bacterial strains and process with *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398 capable of converting cholesterol to 1,4-Androstadiene-3,17-dione (ADD) at about 27% yield, we studied on strain improvement, fermentation condition and whole cell immobilization. By using UV and/or NTG as mutagens, a mutant to convert cholesterol to ADD with higher yield than 60% was selected. Better production of ADD was manifested in the case of maltose used as a supplemental carbon source, and yeast extract or soytone as a nitrogen source. Addition of tween 80 (0.05%) as a surfactant beneficial for increasing the productivity. The optimal initial pH of the medium was 6.5 and optimal culture temperature was 30 °C. Whole cell immobilization by using carrageenan, agar, alginate and acrylamide was carried out and the activity of conversion was tested. In the case of carrageenan and agar, immobilized cells were active for at least two cycles of fermentation.

Keywords: *Brevibacterium lipolyticum* mutant, ADD, fermentation, whole cell immobilization.

스테로이드계 의약품은 피임제, 소염제, 갱년기 장애 조절제, 혈압강하 및 이뇨제 등으로 널리 사용되고 있는 중요한 의약품이다.

스테롤을 분해하는 미생물이 발견된 이래,¹⁻³⁾ 미생물의 스테롤 축적절단 능력을 이용하여 스테로이드 약물의 중간체를 얻을 수 있는 공정개발이 연구되어 왔다. 축적절단 능력이 있는 미생물의 경우 스테롤 핵에 대한 분해력도 동시에 가지고 있으므로 스테로이드 원료물질인 17-ketosteroids를 얻기 위해서는 스테롤 핵 분해효소 저해제를 발효액 중에 첨가하거나⁴⁻⁸⁾ 스테롤 핵에 대한 분해능력을 저지하거나 약화시킨 변이균주를 이용하는 방법이 있다.⁹⁻¹²⁾

최근 Kloosterman 등¹³⁾은 실험공장 규모에서 고

정화 세포를 이용하여 발효기 내에서 연속적으로 hydrocortisone 으로부터 prednisolone 을 생산하는 방법을 발표하여 고정화 세포를 이용한 스테로이드 전환에 관심을 불러 일으킨 바 있다.

본 연구에서는 콜레스테롤로부터 17-ketosteroids로의 전환능력을 가진 것으로 보고된 *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398을 사용하여 변이를 통한 우수균주 선별 및 고정화 세포를 이용하여 스테롤로부터 17-ketosteroids 생산 가능성을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

1. 균 주

동경대학 응용미생물연구소(IAM)로부터 분양받은 *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398 및 *Arthrobacter simplex* IAM 1660을 실험균주로 사용하였다. 균주 보존은 nutrient agar 사면배지를 사용하였으며 상온 또는 4°C에 보존하였다.

2. 시약 및 기구

모든 시약은 특급 또는 1급 제품을 사용하였으며, 기질 콜레스테롤은 Junsei Chem. Co. 제품을, 스테롤 분해효소 저해제로 사용한 α, α' -dipyridyl은 Hayashi Pure Chem. 제품을, 변이제로 사용한 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)은 Fluka Chem. AG 제품을 사용하였다. 세포 고정화에 사용한 담체는 carrageenan(Sigma Chemical Co., U.S.A.), agar(Difco, U.S.A.) alginate(Sigma Chemical Co., U.S.A.) 및 acrylamide(Kokusen Chemical Co., Japan) 등이고 겔 안정화제로 KCl, CaCl₂ 또는 NaCl 등을 사용하였다.

균의 배양 및 발효에는 진탕배양기(한국맨하탄) 또는 incubator(삼화공사)를 사용하였고 발효생성물 확인을 위해 silica gel 60 GF₂₅₄(Merck Co.)로 박층한 TLC plate를 이용하고 정량은 GC(Shimadzu model GC-7AG) 또는 HPLC(Waters Associates model 440)를 사용하였다. 균체 수집에는 high speed centrifuge(Beckman J2-21)를 사용하였다.

3. 발효법

사면배지에 보존되어 있는 균주를 NH₄NO₃ 0.1%, K₂HPO₄ 0.025%, MgSO₄·7H₂O 0.025%, yeast extract 0.5% 조성의 액체배지에 1백금이 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 배양액을 증배양액으로 사용하였다.

증배양과 동일한 조성에 기질 cholesterol 0.1%를 계면활성제 tween 80 0.05%로 분산시켜 첨가한 발효배지를 pH 7.0으로 조절하고 121°C, 15분간 멸균한 뒤 사용하였다. 실험균 또는 고정화 세포를 이식한 후 30°C에서 진탕배양하고 배양 시작 후 18-20시간에 스테롤 핵 분해효소 저해제인 α, α' -dipyridyl을 1mM 농도가 되게 첨가하여 60-72시간 배양시켰다.

4. 발효생성물 분석

생성물의 확인은 최종 배양액을 동량의 ethyl

acetate로 추출한 후 표준액 1,4-androstadiene-3,17-dione(ADD), 4-androstene-3,17-dione(AD) 및 cholesterol(1mg/ml)을 대조로 30 μ l씩 점적한 다음 배양액 중에 존재하는 효소 저해제 α, α' -dipyridyl이 최종 산물과 겹치는 것을 방지하기 위해 점적부위의 1cm 윗 부분에 ehanol에 녹인 AgNO₃ 용액으로 band를 형성시켰다. 전개용매로 chloroform:ethyl ether(10:1v/v)을 사용하여 plate 선단까지 전개시키고 건조한 뒤 UV chamber 안에서 ADD 등 중간생성물의 UV 흡수 spot을 확인하고 10% H₂SO₄로 분무·가열 발색시킨 후 spot의 색과 Rf치를 비교하여 확인하였다.

발효생성물인 ADD는 GC^{14,16} 및 HPLC¹⁷법을 사용하여 정량하였다. GC에 의한 정량법은 Gas Chromatograph(Shimadzu model GC-7AG)를 사용하여 5% SE-30 column(3mm ID×3000mm, 담체 chromosorb WAW DMCS) 240-270-280°C의 column temp-detector temp-injector temp, N₂ carrier gas(60ml/min) 및 감도 Range 10², Att. 2의 조건에서 측정하였으며 이때 ADD 및 cholesterol의 retention time은 각각 3.92 및 7.46 min.이었다.

HPLC에 의한 정량법은 Waters Associates model 440을 사용하여 μ -Bondapak C₁₈ column(4mm ID×300mm, 5 μ m), CH₃OH:H₂O:acetonitrile(1:3:2) solvent, 1.2ml/min flow rate 및 흡광과장 254nm 조건에서 측정하였다. 이때 AD 및 ADD의 retention time은 10 및 13.5 min이었다.

5. 변이를 통한 우수균주 선별

실험균의 ADD 생성력을 향상하기 위하여 UV 및 NTG 등의 변이제로 처리하여 활성이 증가된 변이균주를 선별하였다. 대수기에서 정상기 초기에 있는 세포를 취해 UV light(수직 42cm 거리에서 15분간)를 조사하거나, 사용 직전에 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 조제한 NTG 용액으로 처리하고(최종 농도 200 μ g/ml, 30°C), 원심분리한 뒤 상등액을 버리고 멸균생리식염수로 1-2회 세척한 뒤 멸균생리식염수 소량으로 현탁한 변이제 처리균액을 nutrient agar plate에 도포하여 단일 집락을 얻었다. 이들 각각의 단일 집락을 발효시험하여 이 중

ADD 생성력이 증가된 우수변이균주를 선별하여 보존하였다.⁹⁻¹²⁾

6. 선별균주의 발효조건 검토

변이를 통해 최종 선별한 *Brevibacterium lipolyticum* NTG 9의 최적 발효조건을 검토하였다.¹⁴⁾

배지성분의 영향—발효배지 조성 중의 탄소원과 질소원이 ADD 생성력에 미치는 영향을 검토하기 위해 발효배지에 각종 당류(1%)를 보조탄소원으로 첨가하여 발효배지를 조제하는 한편, 발효배지 조성 중의 질소원인 yeast extract(0.5%)를 다른 유기 질소원으로 바꾸어 각각 0.2% 및 0.5% 농도로 첨가하여 조제한 후 여기에 하룻밤 증배양시킨 균액을 5% 농도가 되게 접종한 뒤 동일한 발효조건에서 발효시험한 다음 각각의 ADD 생성력을 비교 검토하였다.

배양조건의 영향—선별균주의 배양온도 및 발효배지의 초기 pH가 ADD 생성력에 미치는 영향을 살펴보기 위해 30ml 발효배지에 증배양한 균액을 각각 5%씩 일정하게 접종하고 실험온도 27, 30 및 37°C에서 발효시험하였다. 또 발효배지 조제시 초기 pH를 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8 및 9로 각각 조절하고 동일한 방법으로 발효시험한 뒤 ADD 생성력을 검토하였다.

계면활성제의 효과—물에 난용성인 콜레스테롤을 배지 중에 균일하게 분산시키기 위해 각종 계면활성제를 사용하여 각각 0.01, 0.05% 및 0.1% 농도별로 첨가하여 콜레스테롤을 분산시켜 발효배지를 조제한 뒤 증배양한 균액을 각각 5%씩 일정하게 접종한 뒤 동일한 방법으로 발효시험 및 정량하였다.

7. 세포의 고정화^{18,19)}

미생물 세포 고정화에 유용한 entrapment 고정화 방법을 이용하기 위하여 대수기 말기에 도달한 배양액을 원심분리하여 균체를 모으고 담체로 carrageenan, agar, alginate 및 polyacrylamide 등을 사용하여 균체를 고정화시켰다.

Carrageenan^{18,20)}에 의한 고정화—멸균생리식염수 5ml에 젖은 균체 5g을 현탁시켜 균액을 만들고 50°C로 유지하면서 미리 멸균시켜 50°C로 식힌 담체용액 carrageenan type I (1g/20ml) 또는 carrageenan type II (2g/20ml)와 잘 섞은 뒤 병육 중에서 겔화시킨 후 실온에서 0.3M KCl 용액

에 10분간 침적시켰다. 10호체(2×2mm)를 이용하여 절단한 다음 0.3M KCl 로 2회 세척하였다.

Agar 에 의한 고정화^{19,20)}—멸균생리식염수 5ml에 젖은 균체 5g을 현탁하여 만든 균액을 50°C로 식힌 멸균 agar액(0.4g/15ml)과 잘 섞은 뒤 0.3M KCl 용액에 10분간 침적시키고 10호체(2×2mm)를 통과시켜 절단한 뒤, 0.3M KCl 용액으로 2회 세척하였다.

Alginate 에 의한 고정화—균체 5g과 4% sodium alginate 용액 25ml를 혼합한 후 멸균주사기에 넣고 20 gauge 주사바늘을 통해 0.1M CaCl₂ 용액에 적하시켜 bead형 고정화 세포를 얻고 4°C에서 30분간 방치하였다.

Polyacrylamide 에 의한 고정화¹⁸⁾—균체 5g을 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 25ml에 현탁시키고 acrylamide 7.23g과 N,N'-methylene bis(acrylamide) 0.37g을 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 23ml에 녹인 액과 잘 섞은 뒤 지체 없이 N,N,N',N'-tetramethylenediamine 용액(0.1g/ml)과 ammonium persulfate 용액(0.05g/ml)을 1ml씩 가하고 중합이 일어날 때까지 병육 중에서 교반한 후 중합이 일어나기 시작하면 실온으로 옮겨 반응을 완료시켰다. 10호체(2×2mm)에 통과시켜 절단하고 멸균생리식염수로 2회 세척하여 가용성 물질을 제거하였다.

8. 고정화 세포를 이용한 발효법

고정화 세포를 콜레스테롤이 함유(0.1%)된 발효배지 30ml에 넣고 18-20시간 전배양시켰다. 이 때 담체로 carrageenan type II 또는 alginate를 이용하는 경우에는, 겔을 안정화시켜 발효과정 중 세포 손실을 막기 위해 각각 0.1M KCl, 0.05M CaCl₂를 함유하는 발효배지를 사용하였다. 전배양 후 1mM 농도가 되게 α, α' -dipyridyl를 첨가하고 60시간 발효시킨 뒤 여과하여 각각 고정화에 사용하였던 안정화 용액으로 2회 세척한 후 전단계와 동일한 조성의 발효배지에 이식하여 동일한 과정을 거쳐 고정화 세포에 의한 ADD 생성력 및 세포의 반복활용가능성을 검토하였다.

실험결과 및 고찰

변이를 통한 우수 균주 선별—미생물을 이용한 17

Table I—Cell survival ratio by mutagen treatment.

Mutant treatment	Strain	1398		1660	
		The number of colony (No./ml)	Survival ratio	The number of colony (No./ml)	Survival ratio
UV 15 min.		6.6×10^7	3.0×10^{-7}	1.2×10^8	6.0×10^{-7}
NTG		9.3×10^{10}	5.0×10^{-3}	1.8×10^{12}	1.0×10^{-2}
NTG UV* 5 min.		8.8×10^6	5.0×10^{-8}	3.7×10^3	3.0×10^{-11}
NTG UV 15 min.		1.3×10^4	7.0×10^{-11}	2.0×10	1.0×10^{-13}
NTG UV 20 min.		1.1×10^4	6.0×10^{-11}	0	0
Original strain (No./ml)		2.0×10^{14}		1.8×10^{14}	

NTG UV*: After NTG (200 $\mu\text{g/ml}$) treatment (30 min.), UV light was irradiated.

-ketosteroids 생산에 있어 가장 중요한 것은 반응의 주체인 미생물의 활성을 개량하고 이 활성을 꾸준히 보존하는 작업이다.

본 실험에서는 스테롤 전환능력이 각각 ~27% 및 ~10% 정도되는 실험균주 *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398과 *Arthrobacter simplex* IAM 1660에 대하여 UV 또는 NTG를 처리하여 콜레스테롤 축적분해 능력이 향상된 우수 균주를 선별하였다. 변이제 처리가 생존율에 미치는 영향을 Table I에, 발효시험 성적 예를 Table II에서 볼 수 있다. 이 중 ~70%의 전환율을 나타낸 No. 9의 NTG 처리 균주(이하 *Brevibacterium lipolyticum* NTG 9로 표시)를 최종 선별하고 발효시험을 반복 실시하였을 때 60% 이상의 재현성을 나타내어 이 균주에 대한 발효조건을 검토하고 이를 이용하여 고정화 실험을 실시하였다.

선별균주의 발효조건 검토—선별균주 *Brevibacterium lipolyticum* NTG 9의 최적 발효조건을 검토한 결과를 Table III에서 보는 바와 같다.

미생물의 스테롤 전환반응의 기질 스테롤로서는 콜레스테롤이 다른 스테롤에 비해 탁월한 ADD 생성물을 보였고 콜레스테롤 외의 보조 탄소원으로 첨가하여 실험한 당류(1%) 중에서는 maltose가 좋은 효과를 나타내었다. 이는 균성장에 효과적으로 작용한 것으로 생각된다(Table III).

또 질소원으로서의 각종 유기질소원을 사용하여 실험한 결과는 발효배지 조성으로 첨가하는 yeast extract(0.5%) 이외에도 soytone(0.2% 및 0.5% 농도), peptone(0.5% 농도) 등이 우수하였다(Table III).

Table II—The selection of improved strains by mutagen treatment.

Mutagen	Colony No.	ADD production (mg/ml)	Conversion yield (%)
UV 15 min.	1	0.14	19.1
	2	0.47	63.9
	3	0.12	16.3
	4	0.35	47.6
	5	0.41	56.0
NTG	6	0.51	69.4
	7	0.42	57.1
	8	0.39	53.0
	9	0.52	70.7
	10	0.24	32.6
NTG UV* 15 min	11	0.36	49.0
	12	0.14	19.0
	13	0.35	47.6
	14	0.39	53.0
	Original strain	0.21	27.7

NTG UV*: After NTG (200 $\mu\text{g/ml}$) treatment (30 min.), UV light was irradiated.

배양조건으로서의 배지의 초기 pH가 6.5일 때와 배양온도를 30°C로 하였을 때 ADD 생성력이 높았다(Table III).

배지 중에 콜레스테롤을 균일하게 용해시켜 배지 내 유효농도를 높이고 미생물과의 접촉을 원활하게 할 목적으로 사용하였던 계면활성제 중에서는 Table III에서 보는 바와 같이 tween 80을 0.05%

Table III—The fermentation factors for the selected strain *Brevibacterium lipolyticum* NTG 9.

The factor of fermentation	Condition	Concentration (%)	ADD production (mg/ml)
Substrate (Sterols)	Cholesterol	0.1	0.41
	Sitosterol	0.1	0.09
	Stigmasterol	0.1	0.11
Carbon source	Glucose	1.0	0.50
	Fructose	1.0	0.50
	Sucrose	1.0	0.31
	Galactose	1.0	0.22
	Maltose	1.0	0.53
	Lactose	1.0	0.26
	Xylose	1.0	0.13
	Dextrin	1.0	0.20
	Mannitol	1.0	0.44
	Soluble starch	1.0	0.17
	Glucose	5.0	0.26
Nitrogen source	Malt extract	0.2	0.03
		0.5	0.05
	Beef extract	0.2	0.21
		0.5	0.06
	Corn steep liquor	0.2	0.14
		0.5	0.03
	Yeast extract	0.2	0.42
		0.5	0.54
	Bacto soytone	0.2	0.60
		0.5	0.57
	Polypeptone	0.2	0.44
		0.5	0.16
	Bacto peptone	0.2	0.45
		0.5	0.61
	Tryptone	0.2	0.26
0.5		0.13	
Initial pH of the fermentation medium	5.0	.	0.13
	6.0	.	0.37
	6.5	.	0.42
	7.0	.	0.38
	8.0	.	0.17
	9.0	.	0.05
Culture temperature	27°C	.	0.13
	30°C	.	0.31

Table III—Continued

The factor of fermentation	Condition	Concentration (%)	ADD production (mg/ml)
	37°C		0.05
Surfactant	PEG 400	0.01	0.09
		0.05	0.11
		0.1	0.37
	PEG 1500	0.01	0.10
		0.05	0.10
		0.1	0.33
	PEG 4000	0.01	0.11
		0.05	0.08
		0.1	0.14
	Span 20	0.01	0.17
		0.05	0.48
		0.1	0.19
	Span 40	0.01	0.10
		0.05	0.19
		0.1	0.31
Soan 60	0.01	0.10	
	0.05	0.17	
	0.1	0.41	
Tween 20	0.01	0.27	
	0.05	0.48	
	0.1	0.32	
Tween 60	0.01	0.19	
	0.05	0.38	
	0.1	0.30	
Tween 80	0.01	0.16	
	0.05	0.49	
	0.1	0.49	
Propylene glycol	0.01	0.07	
	0.05	0.09	
		0.1	0.39

농도로 사용하였을 때 가장 높은 ADD 생성력을 나타내었다.

고정화에 의한 ADD 생성력—변이를 통하여 선별한 우수 균주 *Brevibacterium lipolyticum* NTG 9 을 carrageenan type I 및 II, agar, alginate 및 acrylamide 등으로 고정화시킨 다음 각각을 발효시험하고 반응액을 분리한 후 고정화 세포를 반복적으로 발효시험을 실시하여 재사용 여부를 조사하

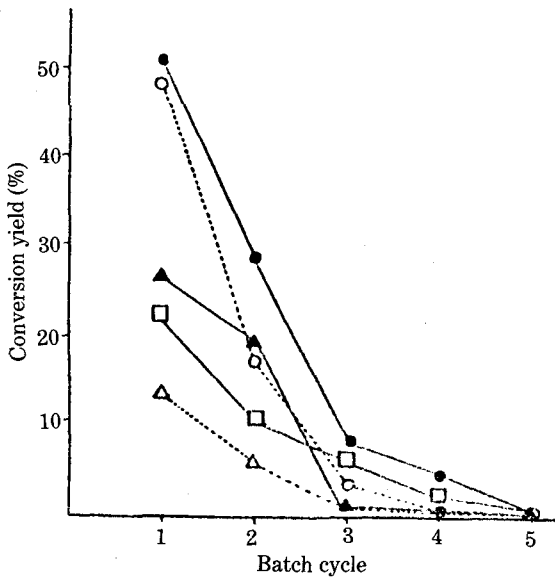


Fig. 1—The formation of 1,4-androstadiene-3,17-dione by the cells of *Brevibacterium lipolyticum* NTG 9 immobilized through Carrageenan type I (●—●), agar (○---○), Carrageenan type II (▲—▲), polyacrylamide (□—□) and alginate (△---△).

였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 반복이용의 횟수가 증가할수록 스테롤 전환 활성은 점차 감소하였으나 2 회 이상 반복 사용에 활성을 나타내었다. 특히 담체로 carrageenan 또는 agar 를 사용하였을 경우 비교적 높은 활성을 보였다.

감사의 말씀

본 실험에 사용한 균주 *Brevibacterium lipolyticum* IAM 1398과 *Arthrobacter simplex* IAM 1660를 보내주신 동경대학 응용미생물연구소(IAM) K. Yamasato 박사께 감사드리며, 이화교수연구기금 연구비 지원으로 본 연구가 수행됨을 감사드립니다.

문헌

- 1) G.E. Turfitt: Microbial agencies in the degradation of sterols. *J. Bacteriol.*, **47**, 487 (1944).
- 2) G.E. Turfitt: Microbial agencies in the degradation of steroids. II. Steroid utilization by the microflora of

soils. *J. Bacteriol.*, **54**, 557 (1947).

- 3) K. Arima, M. Nagasawa, M. Bae, and G. Tamura: Microbial transformation of sterols. Part. I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1636 (1969).
- 4) M. Nagasawa, M. Bae, G. Tamura, and K. Arima: Microbial transformation of sterols. Part II. Cleavage of sterol side chains by microorganisms. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1644 (1969).
- 5) M. Nagasawa, N. Wantanabe, H. Hashiba, G. Tamura, and K. Arima: Microbial transformation of sterols. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 798 (1970).
- 6) C.K.A. Martin and F. Wagner: Microbial transformation of β -sitosterol by *Nocardia* sp. M 29. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 243 (1976).
- 7) C.K.A. Martin: Microbial cleavage of sterol side chains. *Adv. Appl. Microbiol.*, **22**, 29 (1977).
- 8) U. Schoemur and C.K.A. Martin: Microbial transformation of sterols. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, Suppl. 1. *Ferment. Sci. Technol. Future*, 11 (1980).
- 9) N.L. Cargile and J.D. McChesney: Microbiological sterol conversions; Utilization of selected mutants. *Appl. Microbiol.*, **27**, 991 (1974).
- 10) W.J. Marsheck, S. Kraychy, and R.D. Muir: Microbial degradation of sterols. *Appl. Microbiol.*, **23**, 72 (1972).
- 11) M.G. Wovcha, F.-J. Antosz, J.C. Knight, L.A. Kominek, and T.R. Pyke: Bioconversion of sitosterol to useful steroidal intermediates by mutants of *mycobacterium fortuitum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **531**, 308 (1978).
- 12) F.F. Hill, J. Sohndler, R.D. Schmid, R. Wagner, and W. Voelter: Microbial conversion of sterols. 1. Selection of mutants for production of 20-carboxypregna-1, 4-dien-3-one (BNC). *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 25 (1982).
- 13) J. Kloosterman and M.D. Lilly: Pilot-plant production of prednisolone using calcium alginate immobilized *Arthrobacter simplex*. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1390 (1986).
- 14) 배 무, 이강만, 강경희: KIST 보고서 BSE 4632 a, b(1979, 1980).
- 15) 이강만, 배 무: 발효액 중의 1,4-Androstadiene-3,17-dione의 정량법, *Yakhak Haeji* **31**, 402(1987).

- 16) D. Prome, C. Lacave, B., Monsarrat, H., David, and J.C. Prome: Conversion of sterols and triterpenes by mycobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **753**, 60 (1983).
- 17) S.K. Choi, K.S. Kim, and Y.H. Park: Microbial conversion of cholesterol to 4-androstene-3,17-dione by intermittent addition of substrate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 187 (1988).
- 18) J.F. Kennedy, J.F. Cabral, and J.M.S. Cabral: *Biotechnology Vol. 7a*, Verlag Chemie, Weinheim, p. 347 (1987).
- 19) 박선희 : *Rhodopseudomonas* spp. 의 균체 고정화에 의한 수소생성, 이화여자대학교 대학원 석사학위논문 (1988).
- 20) T. Tosa, T. Sato, T. Mori, K. Yamamoto, I. Takata, Y. Nishida, and I. Chibata: Immobilization of enzymes and microbial cells using carrageenan as matrix. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1697 (1979).
- 21) M. Vincenzini, R. Materassi, M.R. Tredici, and G. Florenzano: Hydrogen production by immobilized cells. I. Light dependent dissimilation of organic substances by *Rhodopseudomonas palustris*. *J. Hydrogen Energy*, **7**, 231 (1982).
- 22) M. Kierstan and C. Bucke: The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 398 (1977).
- 23) P.S.J. Cheetan, K.W. Blunt, and C. Buke: Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 2155 (1979).