

## 여러가지 탄소원에 의한 *Pichia pastoris*의 Alcohol-oxidase 생성

이명숙\* · 허성호

\*부산수산대학 미생물학과 · 부산동의공업전문대학 식품공업과

### Synthesis of Alcohol-oxidase in *Pichia pastoris* on Various Carbon Sources

Lee, Myung-Suk\* and Hur, Sung-Ho

\*Dept. of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea.

Dept. of Food Processing, Dong-Eui Technical Junior College of Pusan, Pusan 614-053, Korea.

#### Abstract

The regulation of the synthesis of alcohol-oxidase(E. C. 1. 1. 3. 13) was investigated in the methanol-utilizing yeasts during growth on different carbon sources. For this experiment, *Pichia pastoris* CBS 2612 and *Pichia pastoris* CBM 10 were cultured in mineral salt medium by changing its carbon sources.

The production of alcohol-oxidase was varied by the carbon sources.

For example, alcohol-oxidase was undetectable in all strains submitted to the test in the medium with glucose, but its production was rapidly increased when the carbon source was changed from glucose to methanol after 48hrs of incubation.

Moreover, this enzyme was not synthesized during growth on the primary aliphatic alcohols alone(ethanol, propanol, butanol or pentanol) or on the mixed substrates(0.5% methanol+0.5% primary aliphatic alcohols).

When cells were grown on the various carbon sources(glucose, xylose, lactose, glycerol, galactose, saccharose, sorbose, lactic acid or acetic acid), The alcohol-oxidase activity was detected a very little amounts. These carbon sources together with methanol yielded far better synthesis of alcohol-oxidase than in case of carbon sources alone. Especially, the alcohol-oxidase activity of the cells grown on sorbose, lactose or lactic acid together with methanol was far better or similar than that of cells grown on methanol alone.

The apparent Km values for the methanol of *Pichia pastoris* CBS 2612 and *Pichia pastoris* CBM 10 enzymes were 1.92 and 2.10 mM, respectively. It is also active towards alcohols of shorter alkyl-chain length than C<sub>7</sub>, insaturated alcohols(allyl alcohol, crotyl alcohol) and secondary alcohols (iso-amyl alcohol, iso-butyl alcohol). The affinity of alcohol-oxidase for this alcohols decreased with the increasing length of the alkyl-chain.

#### 서론

Alcohol-oxidase[E. C. 1. 1. 3. 13]는 직쇄 alco-

hols을 분해하여 aldehydes를 생성하는 반응을 촉매하는 효소로서<sup>1)</sup> 각종 alcohols의 분해와 정량, 그리고 방향성물질의 생성에 이용될 뿐 아니라

최근에는 과일주 등에 잔존하는 methanol 제거에 이용하고자 하는 시도가 되고있는 등 산업적인 이용가치가 인정되고 있다.<sup>2-4)</sup>

이 효소는 주로 곰팡이와 효모균체내에서 생성되고 있는데 곰팡이에 의해서는 효소생성량이 극히 적은데 비해<sup>5)</sup> 효모균체내에서는 상당량 생성되며 특히 *Candida boidinii*, *Kloeckera sp.*, *Hansenula polymorpha* 그리고 *Pichia pastoris* 등이 중요한 생성균으로 보고되고 있다.<sup>6,7)</sup> 이러한 효모의 균체내 alcohol-oxidase 함성은 배지 탄소원에 의한 제한을 받아 methanol을 제외한 다른 탄소원에 의해서는 catabolite repression 현상이 일어나 효소합성이 억제되고 있다.<sup>8)</sup> 따라서 catabolite derepression을 일으켜 효소합성을 증대시키기 위해서 methanol이외의 다양한 탄소원에 의한 효소생성능을 비교할 필요가 있는 것으로 사료된다.

한편 이렇게 생성된 alcohol-oxidase는 탄소수 5개이하인 직쇄alcohols 혹은 불포화alcohols에만 활성을 나타내며 다른 2급 alcohols이나 방향족alcohols 등은 전혀 이용하지 못하는 것으로 보고되고 있어<sup>5)</sup> alcohol-oxidase의 이용가치가 제한되고 있다.

따라서 본 연구는 지금까지 연구되지 않았던 *Pichia pastoris* CBS 2612와 *Pichia pastoris* CBM10를 시험균으로 alcohol-oxidase의 생성을 증대시키고 생성효소의 기질이용성을 증진시킬 목적으로 행하였다. 즉 여러가지 탄소원을 사용하여 효소생성능을 비교하였고 또한 생성된 효소를 여러가지 alcohols에 반응시키는 방법과 효소활성측정법을 이미 여러 연구자들에 의해 행해진 정치반응법과 spectrophotometer에 의해 비색측정법<sup>9-11)</sup> 대신 교반반응법과 Gas chromatography, "Headspace"에 의한 측정법을 비교한 결과를 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

사용균주 : 본 실험에 사용된 균주는 *Pichia pastoris* CBS 2612와 *Pichia pastoris* CBM 10였다.

배지 및 배양조건 : 균체의 증식에 사용된 배

지는 mineral salt medium에 탄소원으로 1% glucose를 첨가한 것이었다.<sup>11)</sup> 효소유도는 mineral salt medium에 methanol 혹은 다른 탄소원을 1% 첨가한 것을 사용하였다.

각 배지의 pH를 7.5로 조정하여 500ml용 삼각 flask에 250ml씩 분취 멸균한 다음 접종하여 35°C, 250rpm의 배양기(WTR, INFORS)에서 일정시간 배양하였다.

조효소액의 조제 : Alcohol-oxidase 유도배지에서 일정시간 배양된 균체를 무균적으로 원심분리(3000×g, 15분)하여 인산완충액(10mM, pH 7.5)으로 2~3회 세척한 다음 Ø0.45mm의 glass beads를 첨가하여 high-pressure homogenizer(MSK. BRAUN)으로 5분간 균체를 파쇄하였다. 이 액을 15000×g, 30분 동안 저온(4°C) 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 하였다.

비활성의 측정 : Alcohol-oxidase가 methanol을 분해하여 생성한 formaldehyde를 gas chromatography, "Headspace"(PERKIN-ELMER, Model F20 FE)로 분석하여 활성을 측정하였다.<sup>12)</sup>

즉 methanol 20mM, 조효소액 그리고 인산완충액(10mM, pH 7.5)를 첨가하여 최종 용량을 5ml로 조정한 시험관을 30°C, 250rpm의 shaker incubator(WTR, INFORS)에 넣어 30분간 반응을 진행시켰다.

이 반응액을 "headspace"분석용 용기에 0.8ml 취하고 또한 포화 황산암모늄용액을 1ml, 그리고 0.2ml의 표준물질(1/1500 dilution of butanol)을 넣어 밀폐시켜서 80°C에서 20~25분 가열시킨 다음 분석하여 생성된 formaldehyde를 정량하였다. 이때 사용된 gas chromatography, "Headspace"의 조건은 다음과 같다.

-Chromatography : Perkin - Elmer (Model F 20 FE)

-Column : 1.8m stainless steel, internal diameter 1/8 inch, 15% FFAP on chromosob W 80/100 mesh.

-Temperature : Injection block 200°C  
detection block 240°C

-Detector : FID

— Pressure of gas

Helium : 200 kpa

Air : 150 kpa

Hydrogen : 150 kpa

이때 사용된 효소의 비활성은 단백질 mg당 1 분동안 생성된 formaldehyde의  $\mu\text{mole}$ 수로 표시하였다. 이때 단백질량은 Markwell등<sup>13)</sup>에 의해 수정된 Lowry법<sup>14)</sup>에 따라 정량하였다.

결과 및 고찰

배양시간에 따른 alcohol-oxidase의 생성 : *Pichia pastoris*의 배양시간에 따른 효소생성을 알아보기 위하여 먼저 균체를 1% glucose가 함유된 배지에서 정상기까지 배양(24시간 배양)한 다음 분리하여 1% methanol이 함유된 배지에 재접종하여 배양한 경우(I)와 1% methanol이 첨가된 배지에 직접 균체를 접종 배양한 경우(II)에서

배양시간에 따른 균체의 증식과 효소생성을 비교하였다.

*P. pastoris* CBS 2612를 시험균으로 한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. (I)의 경우(곡선 ①과 ②), alcohol-oxidase활성은 glucose배지에서는 생성되지 않았으나 methanol배지로 이식후에는 45시간경에 최대활성(3.45 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ )에 도달한 후 서서히 감소하였다. (II)의 경우(곡선 ③과 ④)에서는 alcohol-oxidase활성의 증가와 균체증식이 (I)의 경우에 비해 완만하여 배양 30시간경부터 활성이 나타났으며 배양 70시간경에 최대활성(2.67 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ )을 나타낸 후 감소하였다.

곡선 ⑤(Fig. 1)는 균체를 glucose함유배지에서 계속 배양하였을 때의 균체증식을 나타낸 것이며 이때 전 배양기간을 통하여 alcohol-oxidase는 생성되지 않았다.

마찬가지로 *P. pastoris* CBM 10의 실험결과를 Fig. 2에 나타내었다.

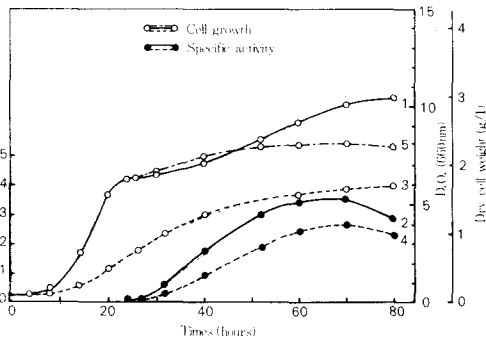


Fig. 1. Growth of cells and production of the alcohol-oxidase of *Pichia pastoris* CBS 2612 in mineral salts medium containing glucose or methanol.

- 1 and 2 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol.
- 3 and 4 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol.
- 5 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose.

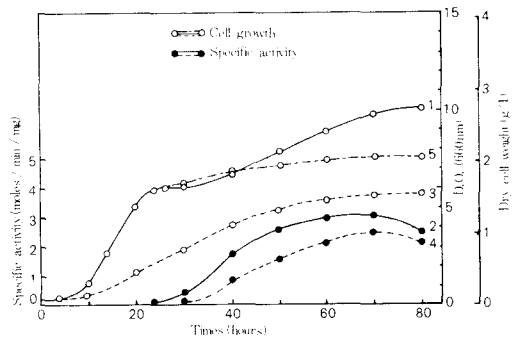


Fig. 2. Growth of cells and production of the alcohol-oxidase of *Pichia pastoris* CBM 10 in mineral salts medium containing glucose or methanol.

- 1 and 2 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol.
- 3 and 4 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol.
- 5 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose.

위의 결과는 *P. pastoris* CBS 2612의 결과와 거의 비슷하였고, 2균주에 의해 (I)과 (II)의 경우에 생성된 총 alcohol-oxidase의 활성을 상세히 비교하여 Table 1에 나타내었다. 2균주 모두 생성된 총 alcohol-oxidase생성은 (I)의 경우가 (II)의 경우에 비해 약 1.6~1.8배 정도 높았고, 균체 증식량도 많았다. 그리고 2균주중 *P. pastoris* CBS 2612가 효소생성능이 더 좋은 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 *P. pastoris* 균체내의 alcohol-oxidase 생성은 glucose에 의해 억제됨을 알 수 있는데 이는 glucose에 의한 catabolite repression에 기인하는 것<sup>8,15)</sup>으로 사료되고 methanol을 탄소원으로 하여 효소를 생성할 때는 균체를 glucose배지에서 증식시킨 뒤 methanol배지에 이식,

배양하는 2단계 배양법이 methanol배지에 균체를 직접 접종 배양하는 경우보다 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

탄소원에 따른 alcohol-oxidase의 생성 : 지금까지 연구된 바로는 탄소원으로 methanol을 사용할 경우 alcohol-oxidase 생성이 가장 좋았고<sup>11,16)</sup> 그외 다른 탄소원의 영향에 대해서는 많이 보고되어 있지 않다. 본 항목에서는 균체를 glucose배지에서 정상기까지 배양한 다음 methanol 혹은 다른 탄소원이 함유된 유도배지에 재접종, 배양하면서 생성된 alcohol-oxidase의 활성을 측정, 비교하였다.

직쇄alcohols : Alcohol-oxidase가 기질로 이용할 수 있는 ethanol, propanol, butanol 그리고 penta-

Table 1. Comparison of the maximum production of the alcohol-oxidase in *Pichia pastoris*

	<i>P. pastoris</i> CBS2612		<i>P. pastoris</i> CBM10	
	I	II	I	II
Specific activity( $\mu$ moles/min/mg)	3.45	2.67	3.04	2.52
Dry cell weight(g/l)	2.88	2.17	2.68	2.17
Amount of protein(mg/g)	82	77	84	79
Total activity(units/l)	818	450	687	436

I, Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol.

II, Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol.

Table 2. Influence of the primary aliphatic alcohols for the products of alcohol-oxidase in *Pichia pastoris* CBS 2612

Substrates	Induction times(hrs)				
	12*	24	30	48	72
Ethanol 1.0% (v/v)	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D
Propanol 1.0% (v/v)	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D
Butanol 1.0% (v/v)	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D
Pentanol 1.0% (v/v)	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D
Methanol 0.5% + Ethanol 0.5% (v/v)	0.012	0.015	0.017	0.009	N. D
Propanol 0.5% (v/v)	0.037	0.045	0.031	0.013	N. D
Butanol 0.5% (v/v)	0.024	0.028	0.021	0.013	N. D
Pentanol 0.5% (v/v)	0.015	0.013	0.006	N. D	N. D

\*, Specific activity( $\mu$ moles/min/mg)

N. D., none detected

nol을 배지 탄소원으로 하여 *Pichia pastoris* CBS 2612의 효소생성능을 비교하여 Table 2에 나타내었다.

Table 2에서 보듯이 alcohol을 단독으로 사용하였을 경우 배양 72시간 동안 효소활성이 전혀 나타나지 않았다. 한편 이들을 methanol과 혼합 사용한 경우에도 배양초기에는 효소활성이 아주 약하게 나타났지만 배양 48시간을 전후하여 거의 소실되었다. 이상의 결과로 미루어 탄소수 2개 이상의 직쇄alcohols을 기질로 하면 alcohol-oxidase합성은 catabolite repression을 받았고 이들을 methanol과 혼합사용하여도 직쇄alcohols에 의해 일어난 catabolite repression은 depression되지 않아 alcohol-oxidase합성은 일어나지 않았으므로 나머지 균주에 대해서는 위의 실험을 행하지 않았다.

Methanol을 농도별로 사용한 경우 두 균주의 alcohol-oxidase 생성능을 Table 3에 나타내었다. 두 균주 모두 methanol 1.0%에서 48시간 배양에 최대활성을 나타내었고 0.5%의 경우에는 효소생성능이 약간 감소하였는데 비하여 2.0%의 경우도 상당량 감소되었음을 알 수 있었다.

여러가지 탄소화합물 : Alcohol-oxidase합성은 탄소원에 크게 영향을 받는 것으로 보고된 바 있으므로<sup>17)</sup> 본 연구에서는 여러가지 탄소화합물 (glucose, xylose, lactose, glycerol, galactose, saccharose, sorbose, lactic acid, acetic acid)을 탄소원으로 사용한 후 alcohol-oxidase의 활성을 비교

하여 Fig. 3에 나타내었다.

먼저 탄소화합물을 단독 사용한 경우 xylose, glycerol, lactic acid에서는 미량의 효소가 생성되었을 뿐이고 saccharose, sorbose, acetic acid에서는 alcohol-oxidase가 전혀 생성되지 않았다.

위의 탄소화합물을 methanol과 혼합 사용한 경우 alcohol-oxidase 생성은 탄소화합물을 단독 사용했을 때 보다 월등히 증가하였고 특히 xylose, lactose 그리고 lactic acid의 경우는 methanol 단독 사용시 보다 오히려 증가하였다.

이때 각 탄소원에서의 효소최대생성에 필요한 시간(Table 4)은 단독 사용시 보다 혼합 사용한 경우에 길었다. 이런 현상은 균체내 alcohol-oxi-

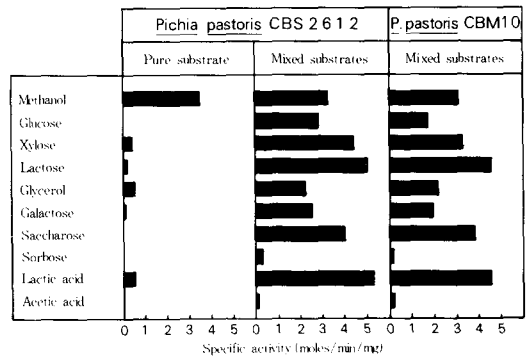


Fig. 3. Comparison of the production of alcohol-oxidase activity on various substrates in *Pichia pastoris*. Pure substrate : 1.0% of substrate, Mixed substrates : 0.5% of methanol+0.5% of the other substrate.

Table 3. Influence of the methanol for the production of alcohol-oxidase in *Pichia pastoris*

Microorganisms	Substrates	Induction times(hrs)		
		30	48	72
<i>P. pastoris</i> CBS 2612	Methanol 0.5% (v/v)	2.28*	3.21	2.71
	1.0% (v/v)	3.20	3.45	2.90
	2.0% (v/v)	2.57	2.83	2.15
<i>P. pastoris</i> CBM 10	Methanol 0.5% (v/v)	2.71	3.00	2.52
	1.0% (v/v)	2.85	3.04	2.65
	2.0% (v/v)	2.25	2.90	3.10

\* , Specific activity(μmoels/min/mg)

Table 4. Induction times of the alcohol-oxidase of *Pichia pastoris* on various substrates for obtention of the maximum specific activity

Substrates	<i>P. pastoris</i> CBS 2612		<i>P. pastoris</i> CBM 10
	I	II	II
Methanol	48*	48	48
Glucose	—	72	72
Xylose	30	48	48
Lactose	30	48	48
Glycerol	48	72	72
Galactose	48	72	72
Saccharose	—	48	48
Sorbose	—	48	48
Lactic acid	30	48	48
Acetic acid	—	30	30

I, Pure substrates(1.0% of substrates)

II, Mixed substrates(0.5% of methanol+0.5% of other substrate)

\*, Induction times(hours)

dase 합성은 glucose 등의 탄소원에 의해 catabolite repression 현상이 일어나 억제되어 있다가 균체가 이런 탄소원을 완전히 소모시키고 난 뒤 methanol에 의해 합성이 시작되는 것으로 사료된다.

Alcohol-oxidase의 기질 특이성 : Alcohol-oxidase의 활성은 기질의 종류와 그 농도, 그리고 생성균주에 따라 약간의 차이가 나며 탄소수 5개 이하인 직쇄 alcohol 혹은 불포화alcohol에서만 활성을 나타낸다고 알려져 있다.<sup>1,6,18,19)</sup> 그런데 이때 모든 연구자들은 효소와 기질을 정치반응시켰고 그때 생성된 formaldehyde와 과산화수소 혼합액에 peroxidase를 첨가하여 발생한 산소를 특정한 지시약인 ABTS : 2, 2'-azino-di(3-ethylbenz thiazoline-6-sulfonate)<sup>3,4,11)</sup> 혹은 O-dianisidine<sup>1,20)</sup>의 산화정도를 spectrophotometer로 비색정량하였다. 따라서 본 연구자 등은 지금까지 시험되지 않은 alcohol을 대상으로 효소를 교반반응시켰으며 효소활성 측정도 formaldehyde를 직접정량(재료 및 방법 참고)하여 alcohol-oxidase의 기질 특이성을 비교하여 Table 5에 나타내었다.

위 Table 5에서 보듯이 alcohol-oxidase의 활성은 탄소쇄가 길어질수록 감소하였으나 methanol의 Km값이 *P. pastoris* CBS 2612의 경우 1.96mM, *P. pastoris* CBM 10의 경우 2.10mM이었고 탄소쇄가 길어질수록 이 값은 증가하였는데 이는 효소가 탄소쇄가 긴 alcohol에 affinity가 감소됨을 나타내었다.

그리고 미약하지만 hexanol, heptanol의 탄소가 6, 7개인 직쇄alcohol과 isobutyl alcohol, isoamylalcohol 등 2급 alcohol에서도 활성을 나타내었다.

즉 alcohol-oxidase를 기질에 반응시킬때 교반을 시킴으로써 alcohol과 효소의 affinity를 증가시킬 수 있었고 반응에 의해 생성된 formaldehyde를 직접 정량하여 나타낸 효소활성이 비색법에 비해 더욱 정확함을 알 수 있었다. Couderc and Baratti<sup>6)</sup>의 *Pichia pastoris* IFP 206의 경우나 Allais et al<sup>21)</sup>의 *Pichia pastoris*의 경우 정치반응법과 비색측정법으로 하였을 때 모두 탄소쇄 5개 이하인 alcohol에서만 활성을 나타내었고 다른 균주의 경우에도 꼭 같은 결과가 보고되고 있다.<sup>1,9,18,19,20)</sup>

따라서 alcohol-oxidase의 이용성을 증대시키기

Table 5. Oxidation of various substrates by the alcohol-oxidase of *Pichia pastoris*

Substrates	<i>Pichia pastoris</i> CBS 2612			<i>Pichia pastoris</i> CBM 10		
	S. A.	(R. A.)	Km(mM)	S. A.	(R. A.)	Km(mM)
Methanol	3.04	(100)	1.92	3.45	(100)	2.10
Ethanol	0.98	(32.2)	7.04	1.13	(32.8)	10.02
Propanol	0.44	(14.5)	11.11	0.51	(14.8)	14.49
Butanol	0.36	(11.8)	29.23	0.43	(12.5)	27.03
Pentanol	0.32	(10.5)		0.36	(10.4)	
Hexanol	0.028	(0.91)		0.031	(0.89)	
Heptanol	0.007	(0.19)		0.010	(0.28)	
Octanol	—			—		
Allyl alcohol	0.92	(30.3)	9.09	0.93	(27.0)	8.79
Crotyl alcohol	0.63	(20.7)	12.34	0.72	(20.9)	13.57
Chloro ethanol	0.23	(7.63)		0.25	(7.17)	
Bromo ethanol	0.21	(6.89)		0.22	(6.42)	
Ethylene glycol	0.014	(0.48)		0.017	(0.49)	
Phenyl ethanol	—			—		
Chloro ethanol	0.23	(7.63)		0.25	(7.17)	
Bromo ethanol	0.21	(6.89)		0.22	(6.42)	
Ethylene glycol	0.014	(0.48)		0.017	(0.49)	
Phenyl ethanol	—			—		
Iso-amylalcohol	0.004	(0.15)		0.005	(0.15)	
Iso-butylalcohol	0.007	(0.23)		0.008	(0.23)	
2-propanol	—			—		
2-butanol	—			—		
Neo-pentylalcohol	—			—		

S. A. : Specific activity( $\mu$ moles/min/mg)

R. A. : Relative activity(%) : specific activity on tested substrate/specific activity on methanol

위해서는 효소반응시 교반시키는 방법과 활성측정은 생성 formaldehyde를 직접측정하는 것이 효과적인 것으로 사료된다.

요 약

*Pichia pastoris*의 배양조건과 배지의 탄소원에 따른 alcohol-oxidase의 생성기능과 alcohol-oxidase의 기질특이성을 실험하기 위하여 *P. pastoris* CBS 2612와 *P. pastoris* CBM 10의 2균주에 대하여 실험하였다.

배양조건에 따른 효소생성은 glucose를 탄소원으로 첨가한 mineral salt medium에서 균체를 정

상기까지 배양하여 methanol이 함유된 배지에서 재배양하는 2단계 배양법의 경우가 균체를 직접 methanol배지에 배양한 경우보다 효율적이었으며 생성된 총효소량도 전자의 경우가 후자에 비해 약 1.7배 정도 많았다.

다음 탄소원에 따른 효소생성능을 비교하였다. 먼저 직쇄alcohol을 탄소원으로 사용한 경우 methanol을 제외한 ethanol, propanol, butanol 그리고 pentanol에서는 효소가 생성되지 않았고 또한 이 직쇄alcohol을 methanol과 혼합한 경우에도 극미량의 생성에 그쳤다.

여러가지 탄소화합물(glucose, xylose, lactose, glycerol, galactose, saccharose, sorbose, lactic acid,

acetic acid)을 탄소원으로 사용하면 methanol에 의해 생성된 효소량보다 훨씬 작았으나 이들을 methanol과 혼합 사용하면 효소생성량은 급격히 증가하였고, 특히 xylose, lactose 그리고 lactic acid의 경우는 methanol 단독 사용시보다 오히려 다량 생성되었다.

시험 2균주 중에서도 어떤 경우에서든지 *P. pastoris* CBS 2612가 alcohol-oxidase 생성능이 더 좋은 것으로 나타났다.

효소의 기질특이성은 효소를 기질에 반응시킬 때는 교반을, 그리고 효소 활성측정은 alcohol-oxidase가 methanol을 분해하여 생성한 formaldehyde를 직접 정량 하였을 경우 탄소쇄가 7개 이하인 직쇄alcohols과 불포화alcohols, 그리고 일부 2급alcohols(isobutyl alcohol, isoamyl alcohol)에도 특이성이 있었다.

## 문헌

- Janssen F. W., and H. W. Ruelius : Alcohol-oxidase, a flavo-protein from several *Basidiomycetes* species ; Crystallization by fractional precipitation with polyethyleneglycol, *Biochem. Biophys. Acta*, **151**, 330.(1968)
- Krug E. R. L., H. C. Lim, and G. T. Taso : Single-cell protein from C<sub>1</sub> compounds, Annual Reports of Fermentation Processes, **3**, 141. (1977)
- Majkic-Singh N., and I. Berkes : Spectrophotometric determination of ethanol by enzyme method with 2, 2-azino-di(3-ethylene thiazoline-6-sulfonate), *Anal. Chim. Acta.*, **115**, 401. (1980)
- Muller H. E. : Detection of hydrogen peroxide by microorganisms on an ABTS peroxidase medium, *Zbl. Bakt. Hyg.*, **259**, 151.(1985)
- Janssen F. W., R. M. Kerwin, and H. W. Ruelius : Alcohol-oxidase from *Basidiomycetes*, Methods in Enzymology, Academic presse, New York-London, **41**, 364.(1979)
- Conderc R., and J. Baratti : Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris* ; Purification and properties of the alcohol-oxidase, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2279.(1980)
- Egging L., and H. Sahn : Growth of *Hansenula polymorpha* on mixed substrates and regulation of alcohol-oxidase synthesis, *Advances in Biotechnology*. Pergamon Press. **1**, 267. (1985)
- Roggenkamp R., Z. Janowicz, B. Stanikowski, and C. P. Hollenber : Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol-oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, *Mol. Gen. Genet.*, **194**, 489.(1984)
- Tani Y., T. Miya, and K. Ogata : The microbial metabolism of methanol ; Part 2. Properties of crystalline alcohol-oxidase from *Kloeckera* sp. N° 2201, *Agr. Biol. Chem.* **36**, 76.(1972)
- Egging L., and H. Sahn : Direct enzymatic assay for alcohol-oxidase, alcohol-dehydrogenase, and formaldehyde-dehydrogenase in colonies of *Hansenula polymorpha*., *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 268.(1980)
- Sahn H., H. Schutte, and M. R. Kula : Alcohol-oxidase from *Candida boidinii*., Methods in Enzymology, Academic presse, New York-London, **89**, 424.(1982)
- Kolb B. : Applied headspace gas chromatography, Heyden Presse, 3rd ed., 23.(1982)
- Markwell M. A. K., S. M. Haas, L. L. Bieben, and N. E. Tolbert : *Analytical Biochemistry*, **87**, 206.(1978)
- Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.(1951)
- Tani Y., Y. Sakai, and H. Yamada : Isolation and characterizing of a mutant of methanol yeast, *Candida boidinii* S2, with higher formaldehyde productivity, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1913.(1984)
- Egging L., and H. Sahn : Depression and partial intensity to carbon catabolite repression of the methanol dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 197.(1978)
- Kato N., Y. Omori, Y. Tani, and K. Ogata : Alcohol-oxidase of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha* ; Catalytic properties and subunit
- Bringer S., B. Sprey, and H. Sahn : Purification and properties of alcohol-oxidase from *Poria contigua* sp., *Eur. J. Biochem.*, **101**, 563. (1979)
- Sahn H., and F. Wagner : Microbial assimilation of methanol ; the ethanol and methanol oxidizing enzymes of the yeast *Candida boidi-*



- ni*, *Eur. J. Biochem.*, **36**, 250.(1973)
21. Allais J. J., A. Louktibi, and J. Baratti : Oxidation of methanol by yeast *Pichia pastoris* Puri-

fication and properties of the alcohol-oxidase, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2547.(1983)

(Received September 28, 1989)