

Bacillus sp.가 생산하는 호알칼리성 Protease 의 부분정제 및 특성

안장우 · 오태광¹ · 박용하¹ · 박관화*

서울대학교 농과대학 식품공학과, 한국과학기술연구원 유전 공학센터*

Partial Purification and Characterization of the Alkaline Protease from *Bacillus* sp.

Ahn, Jang-Woo, Tae-Kwang Oh¹, Yong-Ha Park¹ and Kwan-Hwa Park*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 440-744, Korea
¹Genetic Engineering Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 17, Dae Duk Science Town, Dae Jeon, 305-606, Korea

An alkalophilic microorganism producing a detergent-resistant alkaline protease was isolated from soil and identified as *Bacillus* sp. The alkaline protease has been partially purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Cellulose, CM-Cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. The purified alkaline protease was highly active at pH 12-13 toward casein and stable at pH values from 6 to 11. The optimum temperature for the enzyme reaction was 55°C. The enzyme was completely inactivated by diisopropyl fluorophosphate (DFP) indicating that the enzyme was serine protease, but considerably stable in the presence of surface active agents.

호알칼리성 protease 는 알칼리 범위의 pH에서 최적 활성(1, 2)을 가지며 효소활성 부위에 serine 잔기를 포함하고 있어서, serine 과 특이반응을 하는 물질(3)에 의해서 쉽게 활성을 잃는 특징을 갖는 효소로 알려졌다.

호알칼리성 protease 에 관한 연구는 초기 Oughi 등(4)이 *Streptomyces* sp. 가 알칼리 범위에서 작용하는 protease 를 분비한다고 보고한 이래, Horikoshi(5)는 alkalophilic bacteria, Tsuru(6)는 *Bacillus subtilis*, Kobayashi 등(7)은 *Pseudomonas maltophilia*, Nakaniishi(8)은 *Streptomyces* sp., Hanson 등(9)은 *Neurospora* sp., Bromake 등(10)은 *Serratia* sp., Cohen 등(11)은 *Aspergillus nidulans* 에서 호알칼리성 protease 가 분비된다고 보고하였다.

한편, 합성세제가 하천의 주요 환경오염원으로 알려지면서 세제 중 합성세제의 사용량을 감소시키고 합성세제 대신 효소세제의 사용이 권장되고 있으며 이 때 효소로는 protease, lipase 및 cellulase 가 많이 사용되고 있

다.

이와 같이, 사용되는 세제용 protease 는 작용특성상 detergent 에 대한 내성과 아울러 내열성을 갖는 호알칼리성 효소가 적합한 것으로 알려졌다. 국내에서 알칼리성 protease 에 관한 연구로는 배 등(12), 김 등(13)이 *Bacillus* sp. 에 관해서, 이 등(14)이 *Streptomyces* sp. 에 관해서 많이 연구하여 왔으나, Horikoshi(5)와 Tsuru(6)에 비해서 효소생산성이 낮아서 실용화하기 어려운 단점을 갖고 있었다.

따라서 본 연구에서는 detergent 에 대하여 내성이 있으며, 알칼리 조건에서 높은 활성을 갖는 균주를 산악지 및 하천주변 토양으로부터 선발하여 생산성을 확인하고, 호알칼리성 protease 를 정제하여 효소적 특성과 아울러 세제로 사용 가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선정

하천유역이나 산악지에서 채취한 토양을 멸균수에 현

탁시킴고 그 상등액을 취하여 균주선정용 배지 (glucose, 10g; yeast extract, 5g; peptone, 1g; urea, 3g; K_2HPO_4 , 3g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g; skimmilk, 20g; detergent (Biotex), 5g; agar, 15g; $NaHCO_3$, 10g; sterilized separately and added; distilled water, 1000 ml)에 도말하여 30°C에서 3일간 배양한 뒤 colony 주변에 skimmilk의 분해로 생기는 투명한 부위의 크기가 1 cm 이상인 것을 1차로 선발하였다. 1차로 분리된 11개의 균주를 LB 배지를 이용하여 30°C에서 배양하고 그 중에서 배양액의 호알칼리성 protease의 가장 활성이 좋은 균주를 선정하여 본 실험에서 사용하였다.

미생물의 동정

분리된 미생물의 형태학적 특성과 분류학적 특성은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (18)에서 사용된 방법을 이용하였고 chemotaxonomy를 이용한 분류는 Suzuki 등 (19)의 분류 방법을 이용하여 peptidoglycan 중 diaminopimelic acid isomer 분석 (20), Menaquinone 분석 (21), cellular fatty acid 분석 (19) 등을 실시하였고 최종적인 5S-RNA 분석은 Park 등 (22)의 방법에 의하여 실시하였다.

Protease의 역가 측정

호알칼리성 protease의 역가 측정은 Hagihara 등 (15)의 방법을 이용하여 아래와 같이 측정하였다. 기질용액은 12.5 mM sodium borate NaOH buffer (pH 10.5)에 기질인 casein을 사용 직전에 0.6% (w/v)로 녹여 사용하였다. 2.5 ml의 기질용액에 효소액 0.5 ml을 넣고 30°C에서 10분간 반응시킨 다음 2.5 ml의 TCA mixture (0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid)를 가하고 30°C에서 20분간 방치시킨 후 whatmann filter paper (No. 42)로 여과시켜 얻은 상등액 2 ml에 0.55 M Na_2CO_3 용액, 5 ml와 1 N folin reagent, 1 ml를 차례로 첨가하여 30°C에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 역가 1 unit는 1분 동안에 1 μ g tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정하였다.

Flask 및 발효조 배양

선정된 균주를 효소 생산용 배지 (dextrin, 10g; soy-tone, 5g; polypeptone, 2g; K_2HPO_4 , 3g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g; $NaHCO_3$, 10g; sterilized separately and added; distilled water, 1000 ml)에 접종한 후 30°C에서 20시간 진탕배양한 것을 종균으로 하여 효소 생산용 배

지에 1% (v/v) 수준으로 접종하고 30°C, 150 strokes/min로 유지하면서 배양하였다.

초기 pH에 따른 효소 생산에 대한 영향은 액체 배지의 초기 pH를 8.0에서 11.5까지 0.5 unit 단계로 나눈 후 배양하여 실험하였다.

효소 생산에 미치는 aeration의 영향을 알아보기 위해서 최적 초기 pH로 조정된 배양액을 26 ϕ \times 180 mm 크기의 시험관에 5 ml에서 20 ml까지 용량을 달리하여 넣은 후 배양하여 검토하였다. 균체량의 측정은 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다.

Flask에서 전배양된 배양액을 2.5 liter 발효조 (신영 SY-500, 한국)에 1% (v/v) 수준으로 접종하였고, 2.5 liter 크기의 발효조에 working volume은 1.5 liter로 하고 통기량은 0.5 vvm, 교반은 200 rpm, 배양온도는 30°C, 소포제로는 silicon oil을 0.02% (v/v) 첨가하여 배양하였다.

효소의 정제

본 배양을 마친 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액에 황산암모늄 분획과 투석, ion exchange column chromatography, gel filtration을 이용하여 효소를 분리 정제하였다.

배양액 내의 호알칼리성 protease를 원심분리 (7000 \times g, 10분)하여 얻은 상등액에 황산암모늄을 4°C에서 70%로 포화시킨 후 8000 \times g에서 20분간 원심분리하여 여기서 얻은 침전 단백질을 12.5 mM sodium borate buffer (pH 10.5)에 녹이고, 4°C에서 10 mM phosphate buffer (pH 7.5)로 24시간 투석한 후 한외 여과장치 (amicon社, YM10 membrane)로 농축하여 조효소 용액으로 사용하였다.

농축된 조효소액은 미리 10 mM phosphate buffer (pH 7.5)으로 평형된 DEAE-Cellulose column (3 ϕ \times 30 cm)에 가한 후 20 ml/hr의 속도로 10 ml씩 분획하였고, 통과한 효소액을 한외 여과장치로 농축하여 미리 10 mM phosphate buffer (pH 7.5)로 평형된 CM-Cellulose column (3 ϕ \times 30 cm)에 가한 후 30 ml/hr의 속도로 10 ml씩 분획하였다.

CM-Cellulose column을 통과한 활성부위의 분획물을 모아 농축한 후 미리 12.5 mM sodium borate buffer (pH 10.5)로 평형된 Sephadex G-100 column (2.8 ϕ \times 100 cm)을 이용해서 10 ml/hr의 속도로 10 ml씩 분획하였다.

전기영동

전기영동은 Reisfeld의 방법(16)을 이용하였으며, 단백질의 염색은 Blakesley의 방법(17)에 따라 행하였다. 전기영동 band 상에 효소활성의 위치를 알기 위해 active staining을 하였다.

결과 및 고찰

선정된 미생물의 동정

선정된 미생물은 알칼리 상태에서만 생육하기 때문에 일반적인 분류방법에 의한 분류로는 본 미생물의 정확한 동정이 어려운 것으로 나타났다. 일반적인 동정은 Table 1에 나타난 바와 같고, 이 결과는 전형적인 *Bacillus* sp.나 *Corynebacterium* sp.가 나타내는 형태적 및 생리학적 특성과는 다른 결과임을 알 수 있었다.

형태학적으로 곤봉형을 가지며 Gram variable이라는 특성은 *Corynebacterium* sp.(18)와는 상당히 유사하지만 spore를 가진다는 점이 상이하기 때문에 Suzuki 등(26)이 제안한 화학적 균주 동정법을 이용하여 동정한 결과 Table 2와 같이 나타났다.

Cell wall의 amino acid와 sugar의 조성 중 Diaminopimelic acid(DAP)의 isomer 형태는 Gram 양성균을 동정하는 중요한 인자이고(26), DAP가 meso형으로 존재하는 균주는 *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, 및 *Mycobacterium* 등의 미생물로 분리된다고 Komagata 등(23)이 보고하였다. 하지만, *Corynebacterium*, *Nocardia* 및 *Mycobacterium* 등은 G+C 퍼센트의 조성이 60% 이상되고 Cellular fatty acid의 조성이 주로 탄소수가 16 이상의 fatty acid가 주가된다는 Kroppenstedt 등(24)의 보고에 의하면 선정된 미생물은 *Brevibacterium*이나 *Bacillus*로 분류할 수 있다. 그렇지만, *Bacillus*는 menaquinone을 MK-7, *Brevibacterium*은 MK-8(H₂) 형태로 갖는데, 선정된 미생물은 두 가지 성분을 모두 갖고 있어서 최종적으로 Park 등(22)에 의한 5S-RNA analysis을 한 결과 Fig.1과 같은 결과를 얻을 수 있었고 이와 같은 5S-RNA의 구조는 전형적인 *Bacillus*의 구조이기 때문에 선정된 미생물을 *Bacillus* sp.로 동정하였다. 하지만, 극알칼리 상태에서 생육되는 미생물의 분류학적 연구는 더 진행되어야 하리라고 생각되고 선정된 미생물의 동정에 대한 연구도 더 진척되어야 할 것으로 생각된다.

효소의 생산 조건

발효조를 이용하여 배양한 결과는 Fig.2에서 보는 바

Table 1. General characteristics of microorganism isolated

Parameters	Characteristics
Gram staining	Positive (young cell), Negative (old cell)
Shape	Irregular rod
Size	0.4-0.6 um
Motility	Mobile
Growth	Strictly aerobic growth
Catalase	Positive
Oxidase	Positive
VP test	Negative
Acid from Glucose	Negative
Mannitol	Negative
Inosital	Negative
Sorbitol	Negative
Rhamnose	Negative
Sucrose	Negative
Melibiose	Negative
Amygdalin	Negative
Arabinose	Negative
Assimilation of	
Glucose	Positive
Mannose	Positive
Mannitol	Positive
Maltose	Positive
Gluconate	Negative
Citrate	Positive
Phenylacetate	Negative
Caprate	Negative
Adipate	Negative

와 같다. 접종한 후 초기 20시간 이내에 pH가 9.5에서 8.5 정도까지 급격히 감소하면서 세포생장은 대수적으로 증식하고, 그 후 pH가 점차 상승함에 따라 세포생장이 정지기에 도달하면서 효소 역가가 크게 증가하는 경향을 보였다. 최대 효소 생산은 72시간 배양했을 때 반응액 ml당 4,200 unit 정도였다. 한편, Horikoshi(5)는 6,300 units/ml, Shin(25) 등은 191.5 units/ml, Nakaniishi(8)가 28.9 units/ml, Tsuru(6)는 8,000 units/ml의 역가를 갖는 호알칼리성 protease를 생산한다고 보고하였다.

효소의 정제

조효소액을 DEAE-Cellulose column chromatogra-

Table 2. Chemotaxonomic analysis of the microorganism isolated.

Parameters	
Diaminopimelic acid isomer	meso type
Menaquinone	MK-7, MK-8 (H ₂)
G+C molar content	38.18%
Cellular fatty acid	Iso-15 (27.3%), Anteiso-15 (14.6%) n-16 (14%)

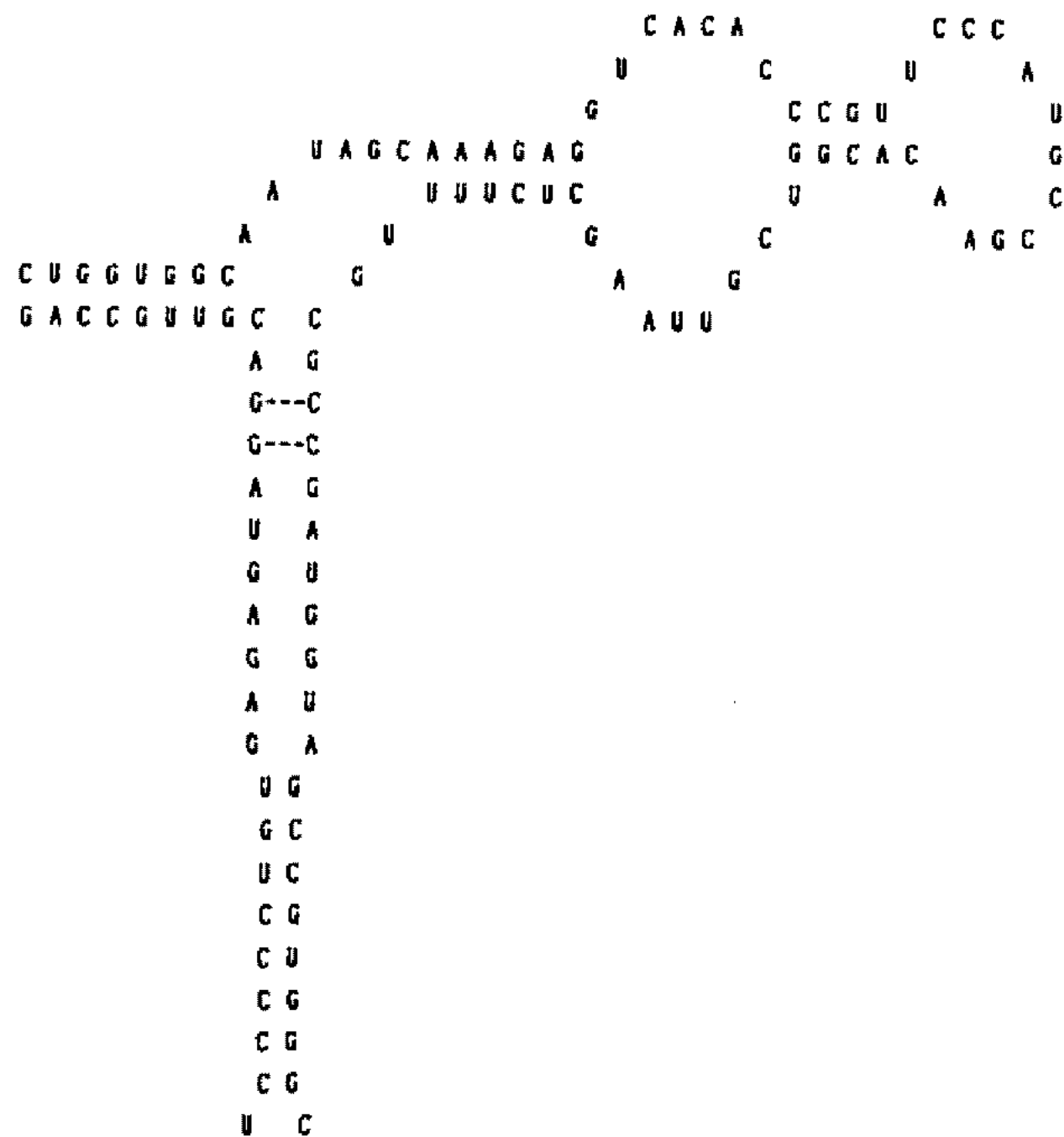


Fig. 1. Secondary structure of 5S r-RNA of the microorganism isolated.

phy로 분리하였을 때, 효소 단백질은 column에 흡착되지 않고 통과하였는데, 이런 결과로써 분리하고자 하는 효소 단백질은 pH7.5에서 양이온을 띠고 있는 것으로 추정되어 다시 CM-Cellulose column을 이용하여 분리한 결과 Fig.3과 같은 chromatogram을 얻었다. 호알칼리성 protease는 흡착되었다가 NaCl 0.25M과 0.4M 사이에서 용출되었다.

호알칼리성 protease를 더 정제하기 위하여 Sephadex G-100 column을 통과시킨 결과는 Fig.4와 같으며 거의 단일한 단백질 band를 얻었다. 총 정제과정은 Table 3에 나타난 바와 같으며 전 정제과정을 통하여 약 10.6배의 정제도를 가진 호알칼리성 protease를 분리할 수 있었다.

분리된 효소를 이용하여 전기영동한 결과, 2개의 단백질 band를 얻었다(Fig.5). 2개의 band 중 protease

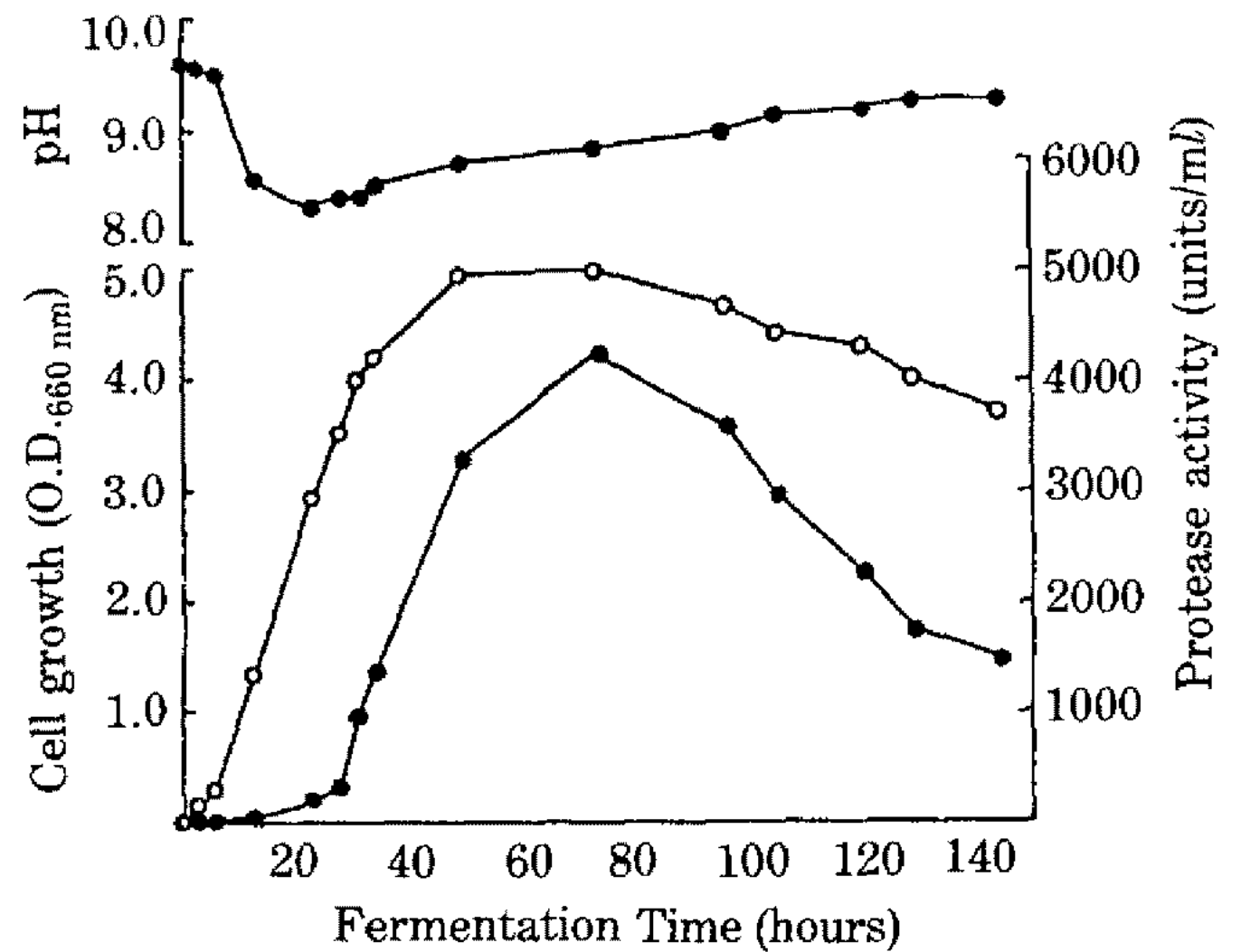


Fig. 2. Growth and alkaline protease production of *Bacillus* sp.

○ : cell growth ● : enzyme activity

의 활성을 갖는 band를 확인하기 위해 active staining을 한 결과 (+)극에 가까운 윗부분에 기질이 분해되어 투명하게 보였는데 이 band가 호알칼리성 protease인 것으로 추정되었다. 따라서 본 실험의 정제과정에서는 조정제된 효소를 얻을 수 있었다.

호알칼리성 protease의 특성

pH의 영향 : 정제된 효소의 최적 pH는 Fig.6에서와 같이 pH12.0~13.0에서 최대로 나타났다. pH stability를 조사하기 위해서 4°C에서 24시간 동안 pH4에서 13까지의 용액상에서 24시간 처리한 결과 Fig.7에서와 같이 pH6.0~12.0까지 안정한 것으로 나타났다. Kobayashi 등(7), Nakanishi 등(8), Hanson 등(9) 및 Bromake 등(10)이 분리한 호알칼리성 protease의 최적 pH가 11.0~12.0, 10.3~10.7, 10.5 및 11.0~12.0으로 나타났는데 비하여, 본 고에서 분리한 protease는 pH 12~13의 극알칼리성에서 최적 pH를 가짐을 알 수 있었다.

온도의 영향 : 정제된 효소의 최적 온도는 Fig.8과 같이 55°C임을 알 수 있었고, 60°C 이상의 온도에서 효소 활성이 급격히 감소하는 경향을 보였다. Horikoshi(5) 및 Kobayashi 등(7)이 발표한 최적 온도와는 거의 비슷하지만 배 등(12)이 발표한 호알칼리성 protease에 비해서는 약간 열등한 결과였다.

효소의 열불활성화 : 호알칼리성 protease를 5mM의 Ca²⁺ 존재하에서 열불활성화를 시킨 결과 Fig.9와 같이 일차반응 kinetics를 가지며 이 관계를 이용하여 D-value와 Z-value를 구하면 Table 4와 같다. 본 호알

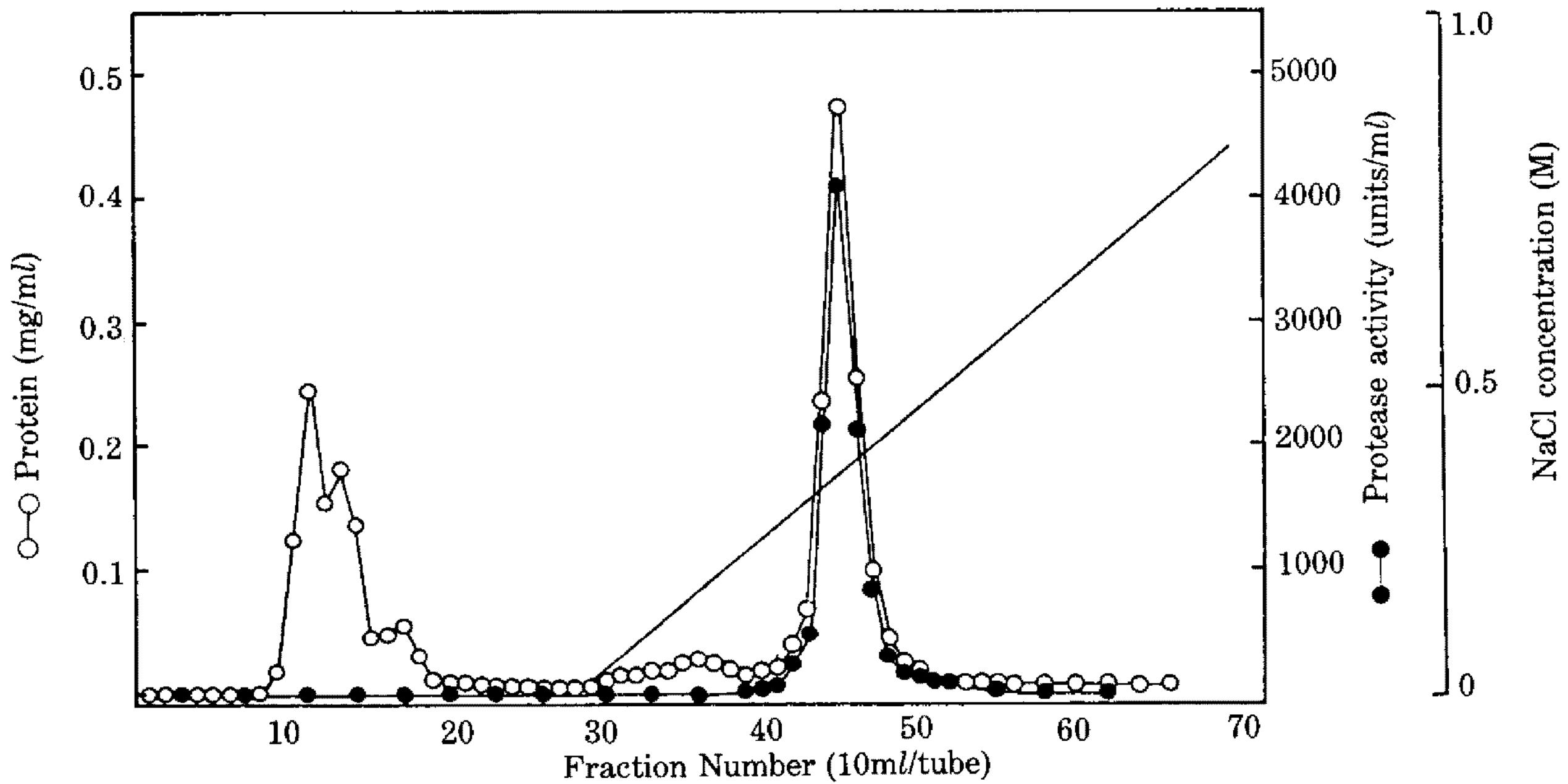


Fig. 3. Chromatogram of the alkaline protease from DEAE-Cellulose on CM-Cellulose column: column size, 3 × 30 cm; flow rate, 30 ml/hr; 0.01 M phosphate buffer, pH 7.5 .

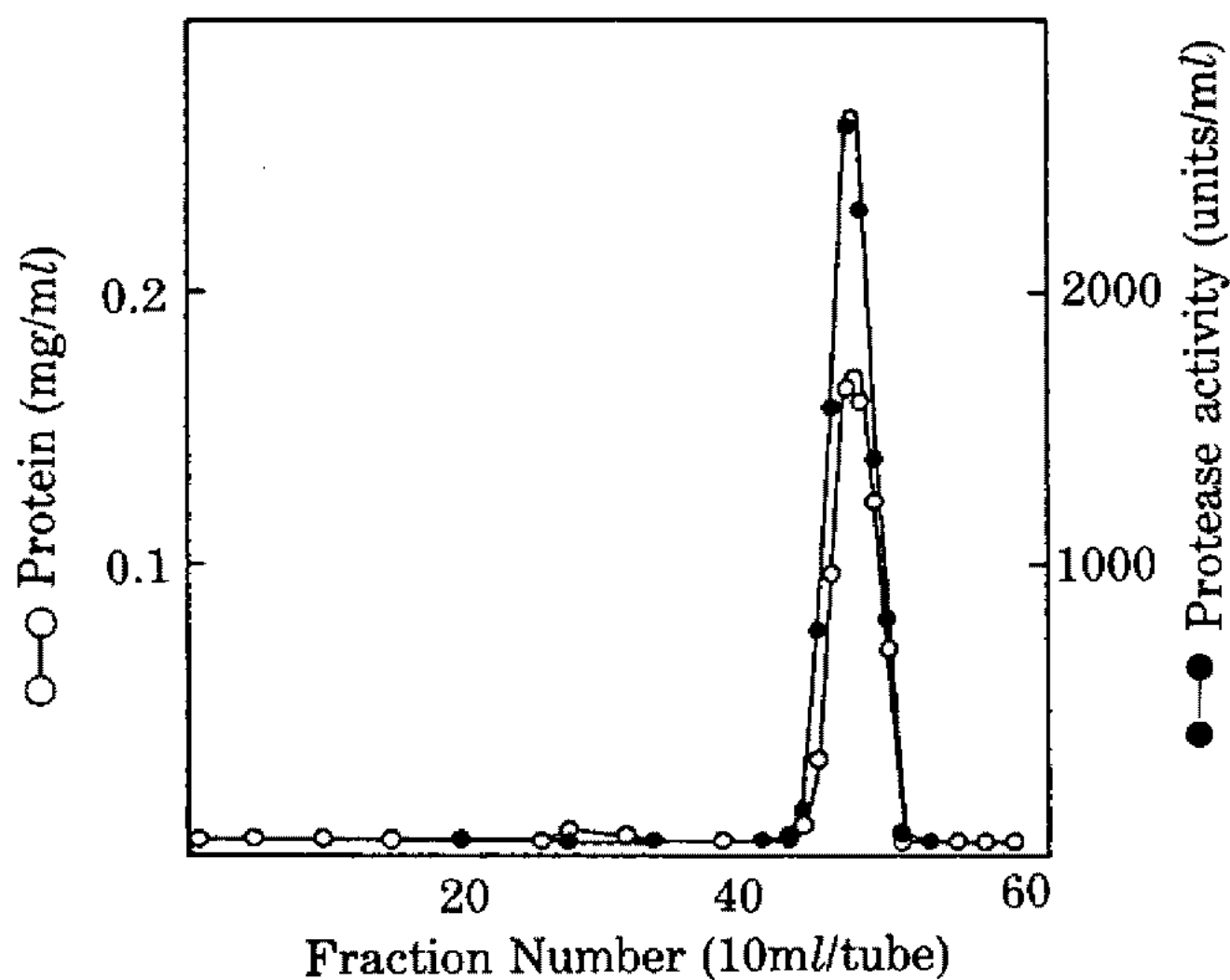


Fig. 4. Gel filtration chromatogram of the alkaline protease from Sephadex G-100: column size, 2.8 × 100 cm; flow rate, 30 ml/hr; 12.5 mM sodium borate buffer, pH 10.5 .

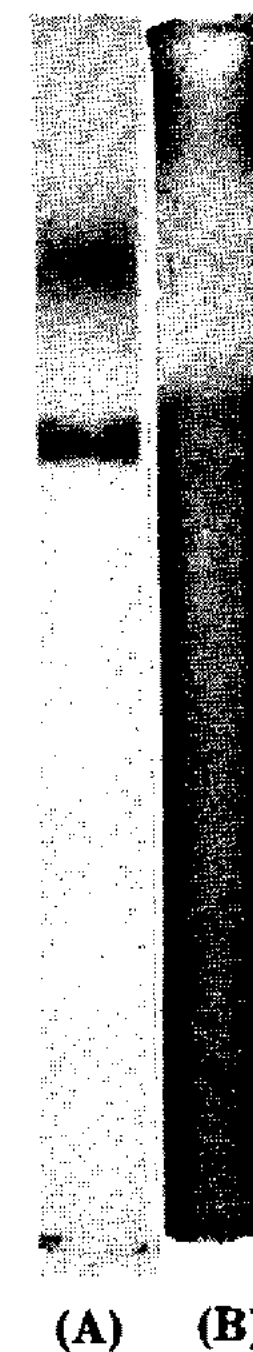


Fig. 5. Disk gel electrophoresis of the purified protease from gel filtration .

a) Electrophoresis using 7.5% acrylamide gel at acidic condition (pH 4.3)
 b) Active staining using the same gel including 0.1% (w/v) casein: The gel was incubated in 12.5 mM sodium borate buffer (pH 10.5) after electrophoresis.

칼리성 protease는 60°C의 온도에서는 급격히 불활성화 되지만 50°C에서는 시간이 경과해도 잔류효소 역가가 상당량 지속되는 것으로 보아 온수에서 세탁할시도 세제용 효소로 사용 가능하리라 판단된다.

Protease inhibitor 및 계면활성제의 영향 : 분리한 효소는 DFP(diisopropyl fluorophosphate)에 의하여 완전히 불활성화 되는 것으로 보아 이 효소는 활성 부위에 serine 잔기를 가지고 있는 serine protease임을 알 수 있었다(Table 5). 한편 SDS(sodium dodecyl sulfate)

에 의하여 약 80%가 저해되나 Tween 80과 Triton X-100과 같은 계면활성제에 대해서는 강한 내성을 나타내었다(Table 6).

H₂O₂의 영향 : 분리한 효소가 산화제인 H₂O₂에 영향을

Table 3. Summary sheet of purification of alkaline protease produced by the *Bacillus* sp. isolated.

Procedure	Vol. (ml)	Tot. Activity (units)	Tot. Protein (mg)	Spe. Activity (units/mg)	Recovery	Purification fold
Culture filtrate	2230	1958565	4549.0	430.5	100.0	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ pptn & dialysis	50	359750	184.8	1946.7	18.4	4.5
DEAE-Cellulose	48	88245	34.7	2544.6	4.5	5.9
CM-Cellulose	109	87009	19.6	4434.7	4.4	10.3
Sephadex G-100	73	62123	13.6	4567.9	3.2	10.6

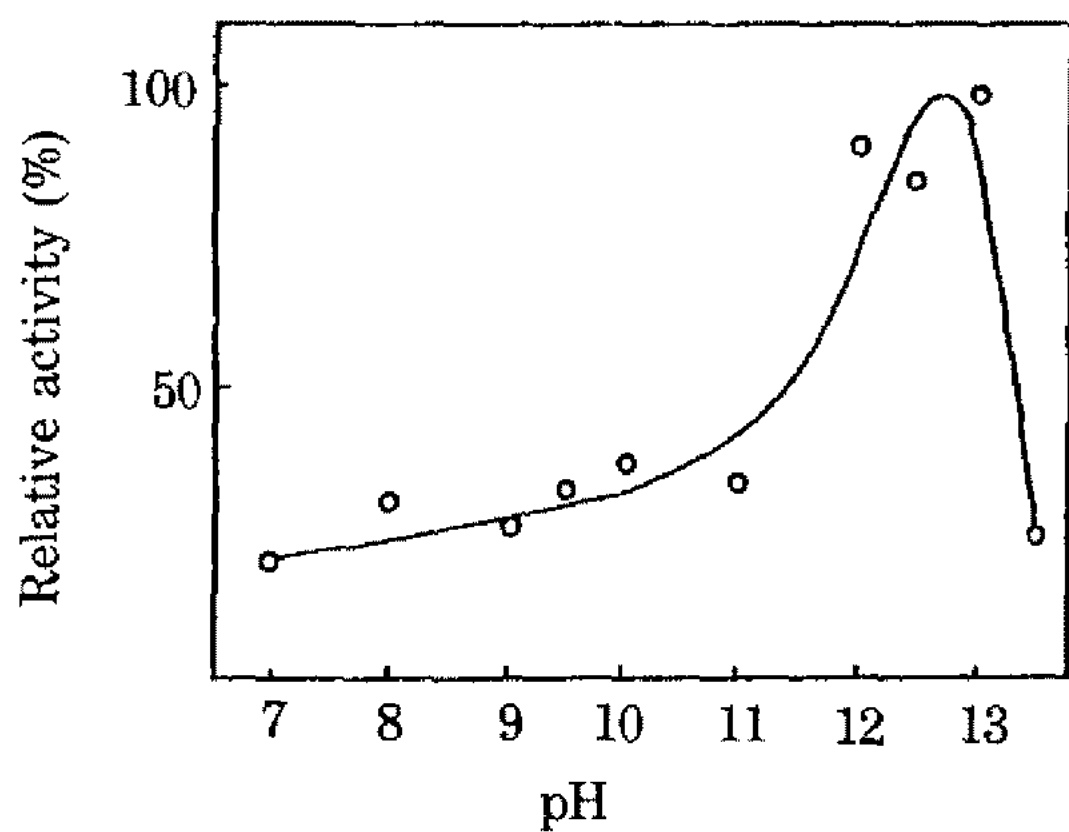


Fig. 6. Effect of pH on the purified protease activity. The following buffer systems were used: 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0-9.0), 0.0125 M sodium borate buffer (pH 9.5-10.0), 0.025 M Na₂ HPO₄, NaOH buffer (pH 10.5-11.0), 0.05 M KCl, NaOH buffer (pH 11.5-13.0) The other conditions were the same as those of the standard assay method.

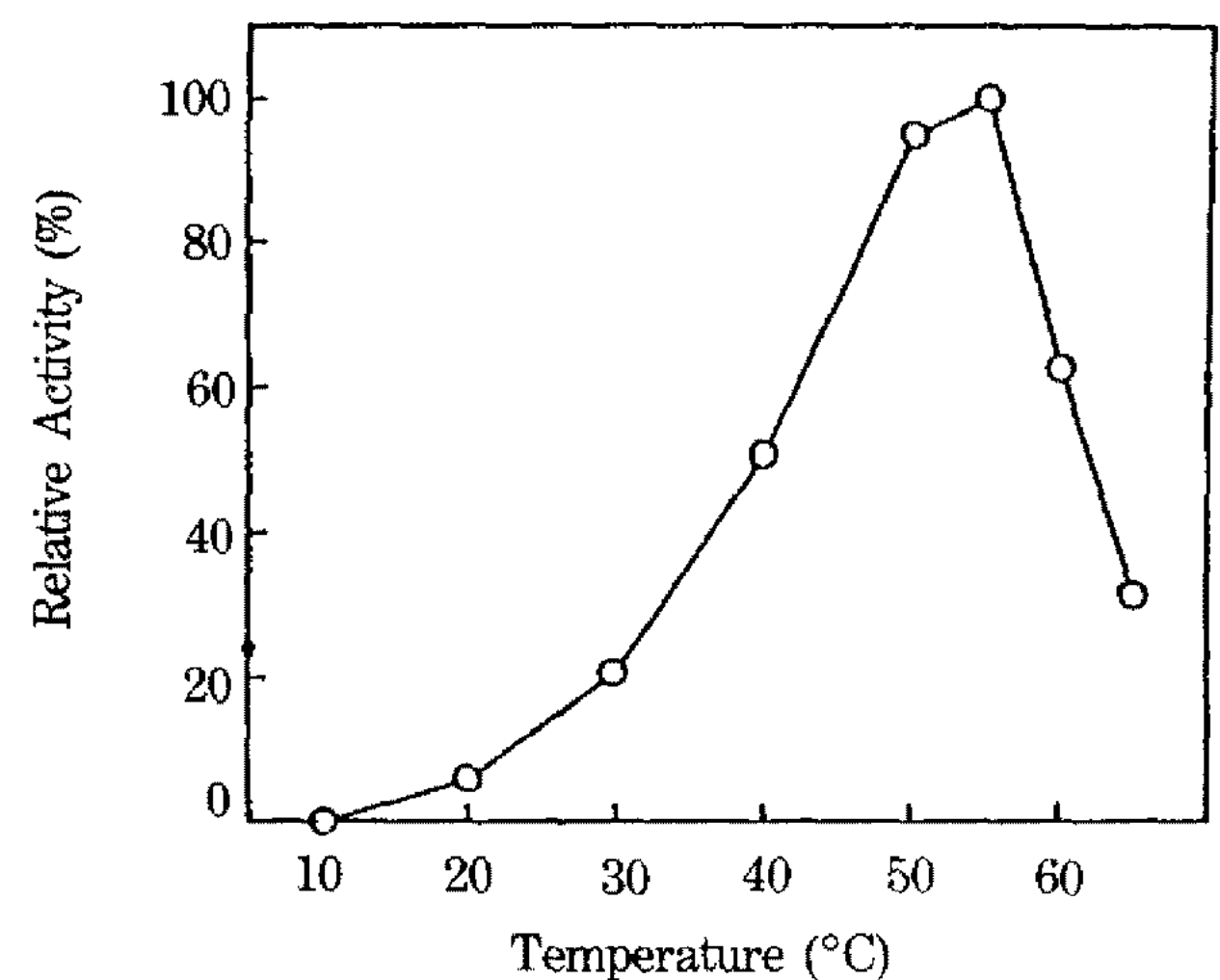


Fig. 8. Effect of temperature on the purified alkaline protease activity. The reaction was carried out at the temperature indicated at pH 10.5 for 10 min.

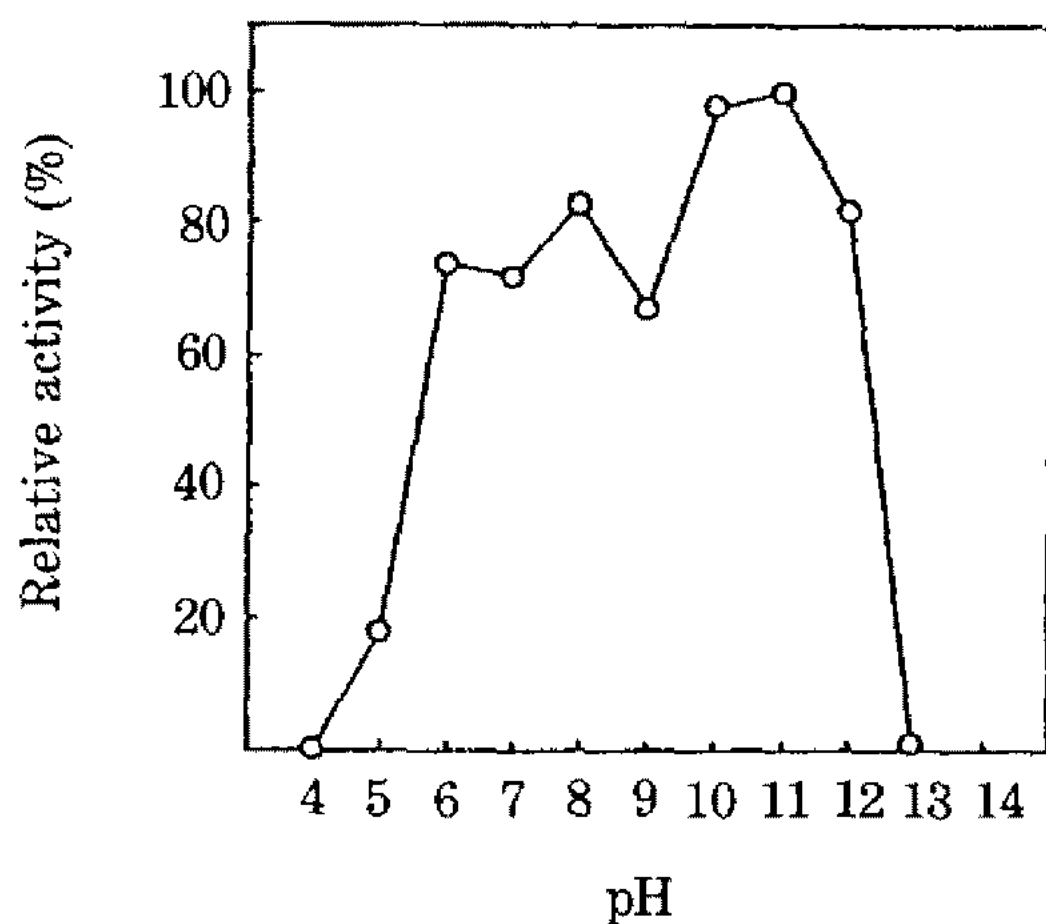


Fig. 7. pH stability of the purified alkaline protease. The following buffer systems were used: 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0-9.0), 0.0125 M sodium borate buffer (pH 9.5-10.0), 0.025 M Na₂ HPO₄, NaOH buffer (pH 10.5-11.0), 0.05 M KCl, NaOH buffer (pH 11.5-13.0). The reaction mixtures were incubated at 4°C for the 30 hours and the remaining activities were measured at pH 10.5.

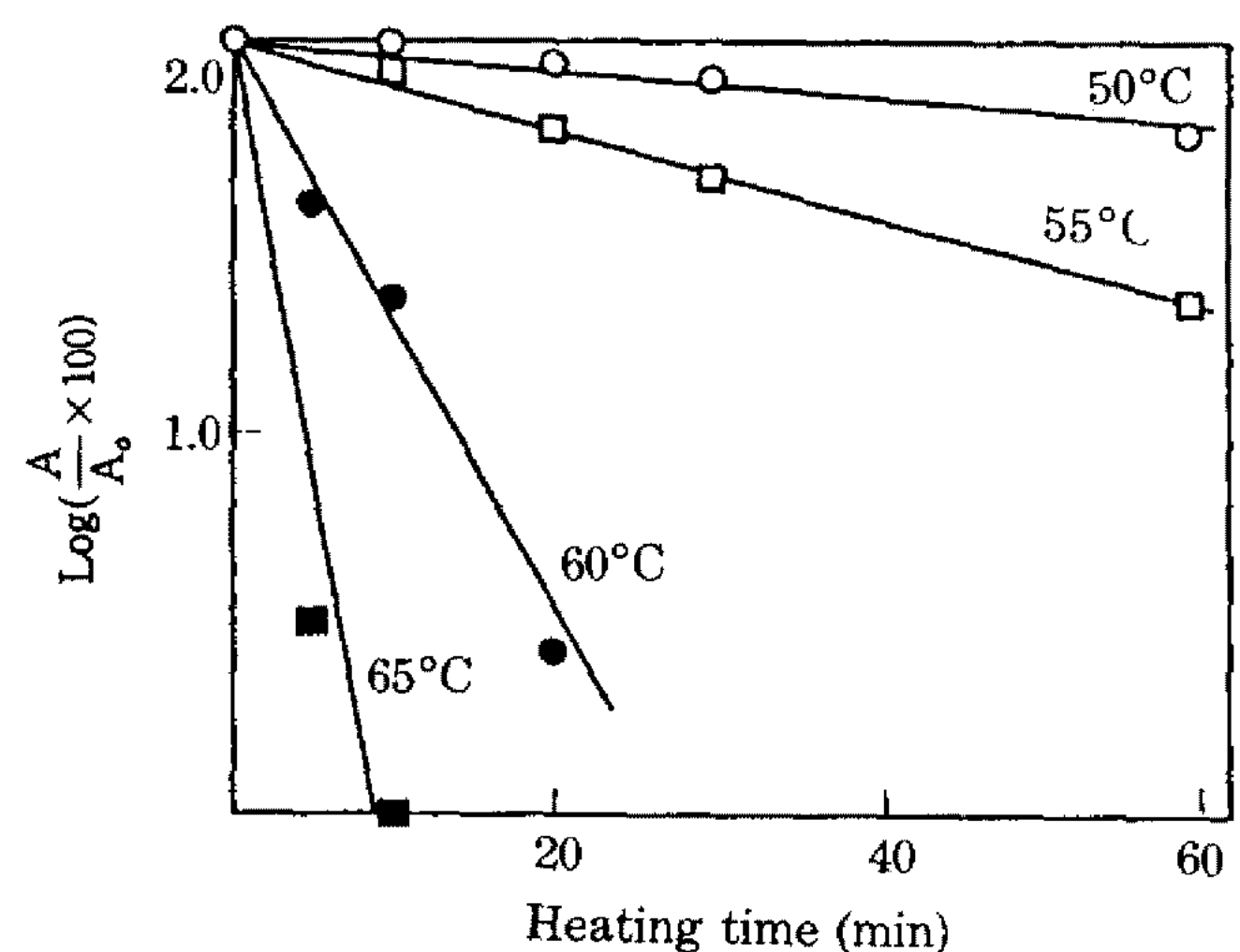


Fig. 9. Thermal inactivation of the alkaline protease produced from isolated *Bacillus* sp. in sodium borate buffer (pH 10.5) in the presence of 5 mM Ca⁺⁺. A₀: Initial enzyme activity, A: Enzyme activity after heat treatment.

Table 4. D-value and Z-value for the inactivation of the purified alkaline protease in the presence of Ca⁺⁺ (5 mM).

Heating temperature (°C)	D-value (sec)	Z-value (°C)
50	17650	
55	5420	7.5
60	810	
65	255	

Table 5. Effect of DFP on the activity of purified alkaline protease .

Chemical	None	DFP* (10 ⁻³ M)
Remaining activity (units/ml)	552	0
Survival ratio (%)	100	0

The mixture of 1.0 ml of enzyme, 2.0 ml of Tris-HCl buffer, pH 7.0, 20 mM and 1.0 ml of the chemical reagent indicated was incubated at 25°C for the 30 min and the remaining activity was determined.

*DFP: Diisopropyl Fluoro Phosphate

Table 6. Effect of various detergents on activity of the purified alkaline protease .

Detergent	Relative activity (%)
SDS (10 ⁻³ M)	22.2
Tween 80 (1%)	148.5
Triton X-100 (10 ⁻³ M)	111.6
Control	100

The enzyme was incubated with the reagent in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) at 25°C for the 1 hr and the residual activity was measured.

받는지 알아보기 위하여 효소용액에 H₂O₂를 1.0 M이 되게 첨가한 다음 일정시간마다 잔존여가를 측정하였다. 비교구로 Alcalase (Novo社)를 1% (w/v) Na₂SO₄ 용액에 10% (w/v)의 농도로 녹인 후 같은 방법으로 H₂O₂의 영향을 조사하였다 (Fig. 10). Alcalase는 H₂O₂의 영향을 받은지 1분 뒤에 약 60%의 활성이 남아있는데 비하여 분리한 효소는 약 50%의 활성을 나타내었다. 이와 같은 현상은 효소 활성부위의 methionine이 산화되기 때문인 것으로 알려져 있는데 본 효소에서도 이와 같은 기작에 의해 불활성화되는 것으로 보인다.

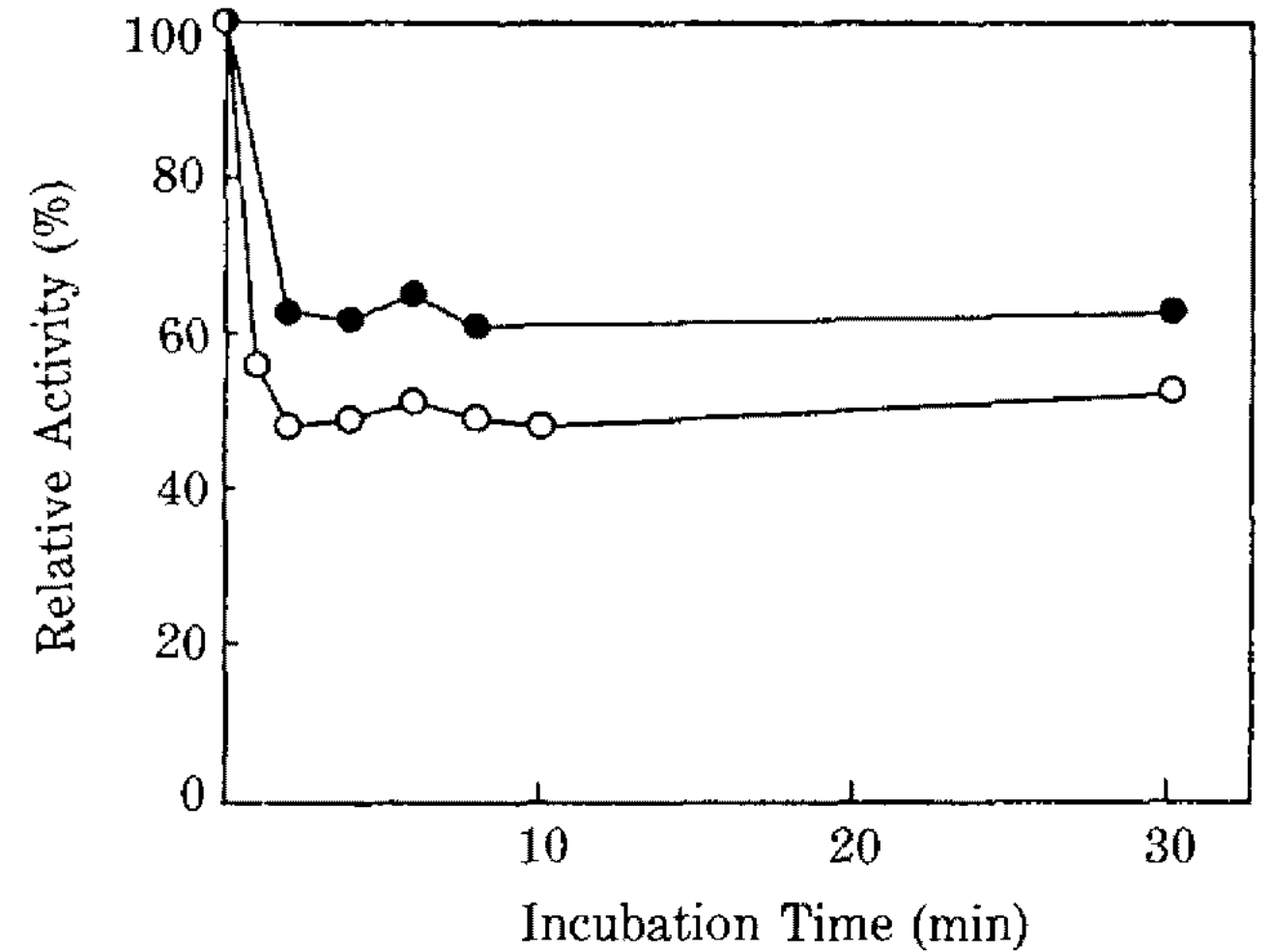


Fig. 10. Effect of H₂O₂ on activity of the purified alkaline protease and Alcalase according to incubation time .

○ : *Bacillus* sp. alkaline protease
● : Alcalase

The alkaline protease of *Bacillus* sp. and Alcalase were incubated in the presence of fresh H₂O₂ (from a fresh bottle) and 0.1 M sodium borate (pH 9.5). After incubation at 25°C for the periods indicated, the remaining activity was measured by the standard assay method.

요 약

계면활성제에 내성이 있으면서 호알칼리성인 protease를 생산하는 미생물을 토양에서 분리하였다. 분리된 미생물을 형태적, 생리학적, 화학분류학적 및 5S RNA 분석으로 동정한 결과 *Bacillus* sp.인 것으로 판명되었다. 호알칼리성 protease는 황산암모늄 분획, DEAE-Cellulose, CM-Cellulose, Sephadex G-100 column chromatography로 분리, 정제하였다. 정제된 호알칼리성 protease는 casein에 대하여 pH 12.0~13.0에서 가장 높은 활성을 보였고 pH 6.0에서 11.0 사이에서 안정성을 나타내었다. 분리된 효소의 작용 최적 온도는 55°C이었다. 이 효소는 diisopropyl fluorophosphate (DFP)로 완전히 불활성화되는 것으로 보아 serine protease로 추정되며 계면활성제의 존재하에서도 안정하였다.

참고문헌

1. Matsubura, H. and J. Fedder: In "The Enzymes (3rd. ed.)", vol. 3, 721, Academic Press, New York and London (1971).
2. Horikoshi, K. and T. Akiba: In "Alkalophilic Microorganisms", Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1982).
3. Shaw, E. and J. Ruscica: *J. Biol. Chem.*, **243**, 6312

- (1988).
4. Oughi T.: *Agri. Biol. Chem.*, **26**, 734 (1962).
 5. Horikoshi, K.: *Agri. Biol. Chem.*, **35**, 1407 (1971).
 6. Tsuru, D. and H. Kira, T. Yamamoto and Fukumota: *J. Agri. Biol. Chem.*, **30**, 1261 (1968).
 7. Kobayashi, T., A. Ogasawara, S. Ito and M. Saito: *Agri. Biol. Chem.*, **29**, 693 (1985).
 8. Nakanishi, T., Y. Matsumura, N. Minamiura and T. Yamamoto: *Agri. Biol. Chem.*, **38**, 37 (1974).
 9. Hanson, M.A. and G.A. Marzluf: *J. Bact.*, **116**, 785 (1973).
 10. Bromake, B.J. and J.M. Hammed: *Can. J. Microbiol.*, **25**, 47 (1979).
 11. Cohen, B.L. and H. Drucker: *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 601 (1977).
 12. 배 무, 박필련: 한국산업미생물학회지, **17**(6), 545 (1989).
 13. 김태호, 박성희, 이동선, 권태규, 김종국, 홍순덕: 한국산업미생물학회지, **18**(2), 159(1990).
 14. Jeong, B.C. and K.J. Lee: *J. Microbiol.*, **26**(4), 355 (1988).
 15. Hagihara, B., H. Matsubara, H. Nakai and K. Okunki: *J. Biochem.*, **45**, 185 (1958).
 16. Reisfeld, R.W., U.J. Lewis and D.E. Williams: *Nature* (London) **195**, 281 (1962).
 17. Blakesley, R.W. and J.A. Boezi: *Analytical Biochem.*, **82**, 580 (1977).
 18. Buchanan, R.E. and M.E. Gibbons: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th. ed.)", The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974).
 19. Suzuki, K. and K. Komagata: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**, 226 (1983).
 20. Schleifer, K.H. and P.H. Siedle: In "Chemical Methods in Bacterial Systematics", Academic Press, 201 (1985).
 21. Collins, M.D., M. Goodfellow, D.E. Minnikim and G. Alderson: *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 77 (1985).
 22. Park, Y.H., H. Hori, S. Osawa and K. Komagata: *J. Bacteriol.*, **169**, 1801 (1987).
 23. Komagata, K. and K.I. Suzuki: In "Method in Microbiology", Academic Press, vol. 19, 161 (1987).
 24. Kroppenstedt, R.M.: In "Chemical Methods in bacterial systematics" Academic Press, 173 (1985).
 25. Shin, H.S. and K.J. Lee: *Kor. J. Microbiol.*, **24**, 32 (1986).
 26. Suzuki, K. and K. Komagata: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 188 (1983).

(Received March 30, 1990)