

Trichoderma viride QM 9414 가 生産하는 Cellulase 特性에 관한 研究

윤은숙 · 이해정*

서울보건전문대학 전통조리과
*경기간호보건전문대학 식품영양과

Studies on the Characterization of Cellulase Produced by *Trichoderma viride* QM 9414

En-Sook Yoon, Hae-Jung Lee

Dept. of Food and Nutrition, Seoul Health Junior College
Dept. of Food and Nutrition, Kyunggi Health Junior College

ABSTRACT

In order to obtain the fundamental informations on cellulase of *Trichoderma viride* QM 9414 for its production and utilization, some physico-chemical properties of the enzyme were reviewed.

When *T. viride* QM 9414 was cultured on wheat bran medium, filter paper-disintegrating and carboxymethyl cellulose(CMC)-saccharifying activity were increased with the cell growth, and thereafter CMC-saccharifying activity was kept on almost the same level while filter-paper disintegrating activity was decreased sharply. And β -glucosidase was formed maximally on the late stationary phase of growth.

The crude cellulase of cell-free extracts was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, Sephadex-G 200 column chromatography and DEAE Sephadex A-50 column chromatography.

Filter paper-disintegrating, CMC-saccharifying and β -glucosidase activity were purified 10-fold, 47-fold and 38-fold, respectively. The crude enzyme was proved to be a complex of three different enzyme proteins which were showing filter paper-disintegrating, CMC-saccharifying and β -glucosidase activity.

The optimal pH of the three enzyme components was alike pH 4.0, and the optimal temperature for CMC-saccharifying, filter paper-disintegrating and β -glucosidase activity were 40°C, 45°C and 50°C respectively.

The K_m and V_{max} values of CMC saccharifying activity for CMC were 0.485% and 3.10($\mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{ml}$), and the K_m and V_{max} values of β -glucosidase for ONPG(o-nitrophenol glucopyranoside) were $0.944 \times 10^{-3} \text{M}$ and 0.097($\mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{ml}$), respectively.

The K_m and V_{max} values of filter paper-disintegrating activity for Avicel were

determined to be 0.09% and 0.178($\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{ml}$), respectively. β -Glucosidase activity was competitively inhibited by glucose, and the K_i value for this enzyme was $3.54\times 10^{-3}\text{M}$, CMC saccharifying activity was found to be greatly inhibited by cellobiose.

I. 緒 論

현재 세계적인 식량 및 에너지 위기가 예고되고 있으며, 이미 지역적으로는 식량부족 현상이 심각하게 나타나고 있는바, 이에 대한 효과적인 대처 방안으로 자연계에 존재하는 가장 풍부한 자원^{1~3)}이며 포도당의 중합체인 cellulose를 식량 및 에너지 자원으로 연구 개발하는 일이 크게 주목을 받고 있다⁴⁾.

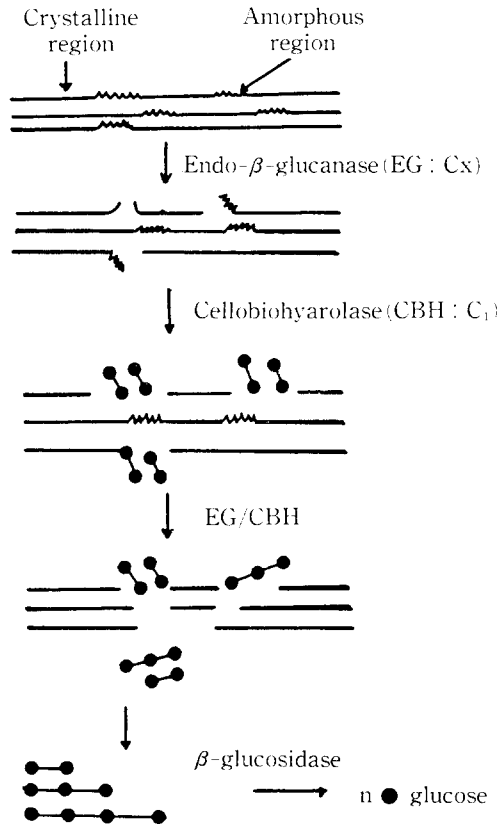
섬유소는 미생물이나 반추동물 등이 일부 분해 이용할 뿐 대부분이 효과적으로 이용되고 있지 못한 실정으로, cellulose를 효과적으로 이용하기 위한 방법으로는 섬유소를 최종 분해산물인 glucose까지 분해되어야 한다.^{5,6)}

섬유소를 분해하는 방법에는 염산이나 황산 등 무기산에 의한 화학적인 방법과 효소에 의한 생물학적 방법이 있는데 전자의 경우 비용이 저렴한 대신 고온, 고압성 요구 및 부식성과 유독성 부산물이 생기며, 또한 산을 제거하기 위하여 중화과정 및 과량의 염이 제거되어야 한다는 단점이 있다. 이에 비해 후자는 포도당 분해효율이 90% 정도로 산 분해효율(60~70%)보다 높으며 부산물이 생기지 않아 현재는 미생물에 의한 효소생산이 많은 노력을 기울이고 있다.

효소에 의한 섬유소 분해연구는 1906년 Seilliere가 달팽이 소화즙 연구를 한데서 시작되어 그 후 세균, 곰팡이, 고등식물, 무척추동물에서도 만들어진다는 것이 알려졌다.

섬유소 분해효소는 섬유소 β -1,4 glucan을 분해하며 β -D glucose를 생산하는 β -1,4 glucan-4-glucanohydrolase로 분류되는 효소로서, 일반적으로 단일성분이 아니라 효소복합체로 보는 경향이 많으며, 이와 같은 가 성분설은 Reese⁷⁾등에 의해 C_1 - C_n 개념이 제안된 후 섬유소 분해효소

에 대한 연구가 활발히 일어나 Halliwell⁸⁾, King⁹⁾, Shelby¹⁰⁾, Wood¹¹⁾등도 섬유소 분해 기작에 대한 보고를 했다. 이제까지 보고되어 있는 cellulase의 기작을 살펴보면 아래 그림과 같이 분효소는 1,4- β -D-glucan-4-glucano hydrolase (EC 3.2.1.4) (endoglucanase), 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase (E.C 3.2.1.91) (cellobiohydrolase)와 -glucosidase (EC 3.2.1.21) (cellobiase)로 구성되어 있으며, endoglucanase는 β -1,4 결합을 무작위적으로 분해하고 cellobiohydrolase는 사슬의 비환원성 말단



으로부터 cellobiose 단위로 분해하며 cellobiase 는 cellobiose 를 glucose 로 분해하는 것으로 알려져 있다.

또한 cellulase 는 섬유소 존재시 효소를 생산하는 유도효소(inducible enzyme)으로 알려져 있는데 실제 유도체(inducer)가 cellulose 자체보다 cellobiose 라는 사실¹²⁾이 유력하며, 한편 본 효소는 섬유소의 분해산물인 glucose 에 의해 강력한 합성저해를 받는다는 사실이 보고되고 있다.

섬유소분해효소를 생산하는 미생물로서는 *Trichoderma*¹³⁾, *Aspergillus*¹⁴⁾, *Penicillium*¹⁵⁾, *Irpex*¹⁶⁾, *Fusarium*¹⁷⁾, *Hemicola*¹⁸⁾속의 곰팡이와 세균으로서는 *Clostridium*¹⁹⁾, *Cellulomonas*²⁰⁾, *Pseudomonas*²¹⁾ 등이 있으며 방사선균으로서는 *Streptomyces*²²⁾, *Thermomonospora*²³⁾속이 보고되고 있다.

Cellulase 에 대한 중요성은 앞서도 언급되었던 바와 같이 산업적, 경제적으로 그 역할이 지대하며 그 분해산물이 식량 내지는 사료로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 sigle cell protein 생산의 탄소원으로 제공될 수 있다는 점을 고려할 때 본 효소 생산은 시급한 과제에 하나라 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 cellulase 를 생산하는 균주중 현재까지 가장 높은 역가를 생산한다고 알려진 *Trichoderma viride* QM 9414 를 이용, cellulase 에 대한 효소학적 성질과 작용기작을 검토함으로써 효소 생산에 있어서의 기초자료를 제공하고자 하였다.

II. 材料 및 方法

1. 使用 菌株

本 實驗에 使用한 *Trichoderma viride* QM 9414 U.S Army Natick Laboratory 에서 제공 받았으며 potato dextrose agar(Difco)에 접종 후 28°C 4 일 배양하여 4°C 보존하였다.

2. 使用培地

Cellulase 生産배지로는 밀기울 5 g 에 증류수 4

ml 가 되도록 121°C, 15 분 살균후, 사용하였다.

3. 培養方法²⁴⁾

Trichoderma viride QM 9414 보존용 slant 에 멸균수 10 ml 을 가하여 균사 현탁액을 조제후, 0.5 ml 을 취하여 cellulase 생산배지에 접종시켜 28°C에서 정지배양하였다.

4. 生菌數 測定²⁵⁾

배양 밀기울에 10 배의 증류수를 가하고 연속 희석하여 potato dextrose agar plate 에 도말 colony 수를 측정하였다. Plate 에는 colony size 를 제한할 목적(균사번식억제)으로 Rose bengal 50 µg/ml 을 첨가하였다.

5. 粗 酵素液 調製

밀기울 배양물에 10 배(V/W)의 증류수를 가한 후 왕복 진탕배양기(120 rpm)에서 2 시간 진탕, 효소를 추출한 후 6000×g에서 30 분 원심분리한 상층액을 조효소액으로 하였다.

6. 효소 活性의 測定

1) Filter paper(C₁-cellulase)분해활성 측정²⁶⁾
기질로 filter paper Toyko, No. 2 를 1.0×1.0 cm 크기로 잘라 L-type tube(8.0×12.0×1.5(φ)cm)에 0.1 M acetate buffer(pH 4.0) 1 ml 와 효소액 5 ml 를 넣은 후 45°C에서 반응시켜 filter paper 가 붕괴될 때까지 소요된 시간을 측정하였으며 150 분에 완전 붕괴시 10,000 unit 로 하였다.

$$1 \text{ Unit} : 150/X_1 \times 10,000$$

X₁ : 여러 단편 2 장이 붕괴하는데 걸린 시간 (min)

2) Avicel 분해활성 측정

기질 Avicel(microcytalline cellulose)을 0.1 M acetate buffer(pH 4.0)을 사용 1% 용액으로 조제하고 기질 2 ml 에 효소액 0.2 ml 을 가한 후 45°C에서 2 시간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson^{27,28)}에 의해 상층액중 환원당을 측정하였다. 또한 1 unit 는 1 분간 1 µmole 의 환원당을 생성하는 효소량으로 정하였다.

3) Carboxymethyl cellulose(CMC) 분해 활성(C_x -cellulase) 측정^{29,30)}

기질은 CMC를 0.1 M acetate buffer(pH 4.0)를 사용 1%용액 조제후, 기질용액 0.5 ml에 효소액 0.5 ml을 가하고 40°C에서 20 min 반응시키고 dinitrosalicylic acid(DNS)시약 3 ml를 가하여 상층액중의 환원당을 측정하였다.

효소활성 1 Unit는 1분간 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소량으로 하고 비활성은 단백질 mg당 Unit로 표시하였다.

4) β -glucosidase 활성 측정

기질로 o-nitrophenol glucopyranoside (ONPG)를 사용하였으며 이를 0.1 M acetate buffer(pH 4.0)으로 1 mM 용액으로 조제후, 1 ml의 기질에 0.2 ml 효소액을 가한 후 50°C, 30 min 반응시킨 뒤 1 M Na_2CO_3 용액 2 ml을 가하여 반응 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소활성 1 Unit는 1분당 1 μ mole의 ONP를 생성시키는 효소량으로 하였다^{31~33)}.

7. 효소의 정제³⁴⁾

전 과정은 0.05 M acetate buffer(pH 4.0)을 사용하였고 4°C에서 행하였다.

1) Ammonium sulfate에 의한 염석

조효소액에 분말($(NH_4)_2SO_4$)을 20%용액이 되도록 가한 후 하룻밤 정치후 10,000 \times g에서 원심 분리하여 침전을 제거하고 상층액을 다시 70% 포화시켜 얻은 침전물을 소량의 buffer에 용해시키고 동일 buffer를 이용 dialysis를 행하였다.

2) Sephadex-G 200 Column Chromatography

Sephadex-G-200을 충전시킨 column(ϕ 1.9 \times 100 cm)에 효소액을 상층부에 가하고 동일 buffer를 이용하여 gel 여과(유속 6 ml/hr)하여 6 ml씩 분획하였다.

분획분중 효소활성이 있는 부분은 모아서 $(NH_4)_2SO_4$ 로 80% 포화시켜 침전물을 투석하였다.

3) DEAE Sephadex A-50 column chromatography

상기 효소액을 평형시킨 DEAE Sephadex A-50 column(ϕ 2.2 \times 20 cm)에 충전하고 동일 buffer로 수세한 후 0.05~0.4 M 까지 염 농도구배를 주어 흡착 단백질을 용출시켰다.

8. 蛋白質의 정량³⁵⁾

Lowry 법에 따라 bovine serum albumin을 표준물로 사용하여 정량하였다.

III. 結果 및 考察

1. 培養時間에 따른 cellulase의 活性

Cellulase 생산용 배지에 *Trichoderma viride* QM 9414를 정치 배양하면서 배양시간에 따른 세포증식과 cellulase 활성, pH 변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

세포증식은 배양 1~3일의 대수증식기를 지나 4일부터 정지기에 해당하는 배양양상을 보였으며 pH 변화는 전반적으로 6~6.8 부근을 나타내었다.

또한 배양과정중 cellulase 생산관계를 조사해 본 결과 filter-paper 분해활성과 CMC 분해활성은 균체증식과 함께 배양 6일까지 증가하였으며 7일 이후에는 CMC 분해활성은 일정수준을 유지하는 반면, filter paper 분해활성은 급격히 감소하는 경향을 보였다.

β glucosidase 활성은 8일까지 완만한 증가추세를 보이다가 급격히 감소하는 양상을 나타내었다.

이러한 효소활성의 변화는 효소반응의 분해산물에 의한 효소생성의 억제 내지는 반응저해, 배양 시간 경과에 따른 효소의 분해 등이 그 원인으로 생각되어 이후 각 효소활성에 대한 반응생성물의 영향을 우선적으로 검토하였다.

2. 酵素의 精製

Fig. 2는 ammonium sulfate 20~80%포화 분획을 투석과정을 거쳐 Sephadex G-200 column을 이용 gel 여과한 결과이다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 본 연구에서 조사한 3종의 cellulase 활성은 거의 분리되지 않았으며

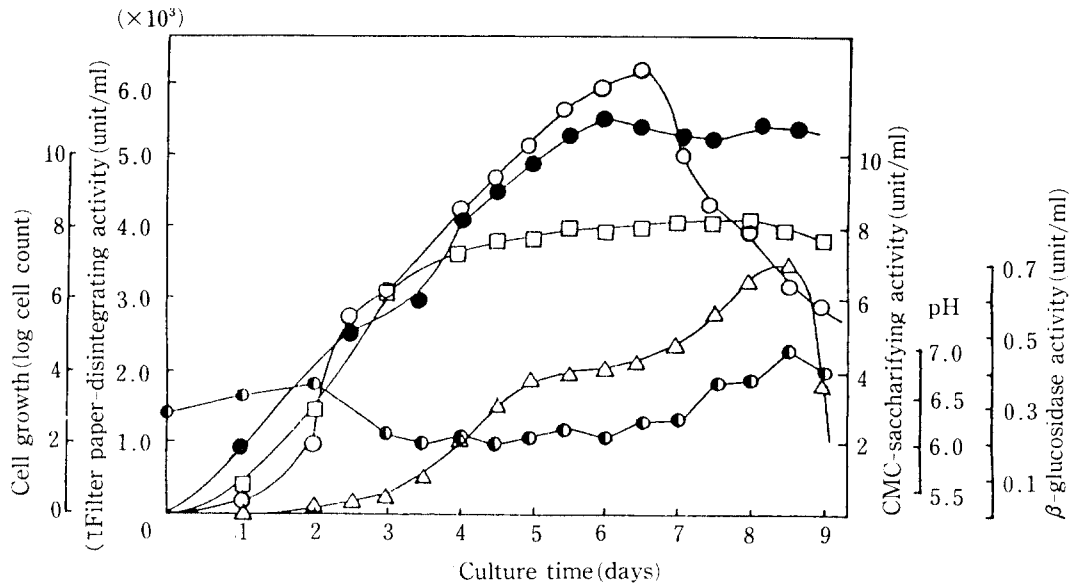


Fig. 1. Time course of the extracellular cellulase production by *Trichoderma viride* QM 9414. \square , Cell growth(log cell count) ; Δ , β -glucosidase activity(unit/ml) ; \bullet , CMC-saccharifying activity(unit/ml) ; \circ , Filter paper-disintegrating activity (unit/ml) ; \ominus , pH.

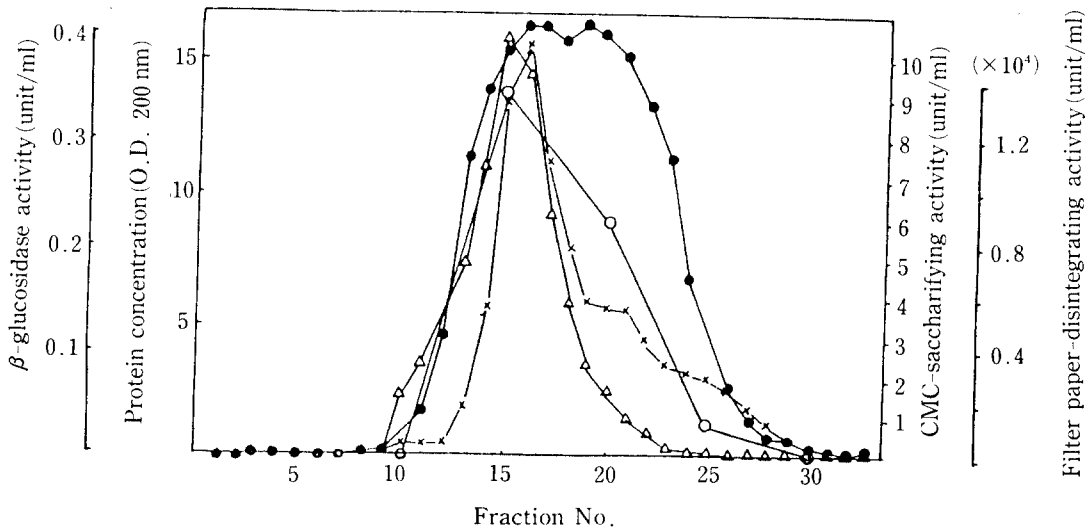


Fig. 2. Elution pattern of cellulase complex on Sephadex G-200 column chromatography. \times , Protein concentration(O.D.280 nm) ; Δ , β -glucosidase activity (unit/ml) ; \bullet , CMC-saccharifying activity (unit/ml) ; \circ , Filter paper-disintegrating activity(unit/ml)

Table 1. Purification of cellulase from *T. viride* QM 9414.

Procedure of purification	Total protein (mg)	Total activity (Units)			Specific activity (Units/mg protein)		
		Filter-paper act.	CMC β -glucosidase act.	act.	Filter-paper act.	CMC β -glucosidase act.	act.
Cell-free extract	1,860	1,810,250	1,354	111.2	973	0.73	0.06
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-703	354	1,597,630	889	32.4	4,513	2.50	0.09
Sephadex G-200	280	1,460,250	850	28.5	5,215	3.00	0.10
DEAE Sephadex A-50							
SI. (β -glucosidase)	8.8	—	—	20.0	—	—	2.3
S III. (CMC activity)	12.2	—	420	—	—	34.4	—
S IV. (Filter paper act.)	98.2	925,600	—	—	9,420	—	—

CMC 분해활성은 더욱 완전치 못하여 넓은 2 개의 넓은 peak 를 나타내고 있다. 이러한 결과는 다른 연구자³⁶⁾들에 의한, 본 균주의 cellulase 분리 chromatography 의 결과와도 잘 일치하였다.

세 효소의 활성이 비교적 높고, 단백질 함량이 높았던 분획을 모아, DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography 를 통해 용출, 분리시킨 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 filter paper 활성을 나타내는 효소는 비교적 잘 분리되었으나 β -glucosidase 와 CMC 활성효소는 잘 분리되지 않았다.

그러나 본 실험결과는 현재까지 보고된 각종 cellulase 분리정제에 관한 다른 연구자의 결과와 일치하는 것으로 본 연구에서 조사한 3종의 cellulase 활성이 서로 다른 기질 특이성을 갖는 단일 효소 단백질에 의한 효소활성이 아니라, filter paper 분해활성, CMC 분해 활성 및 β -glucosidase 활성을 나타내는 효소 등 3개의 서로 다른 효소 단백질에 의한 분해활성이 분명하였다.

이상의 정제과정을 요약하면 Table 1 과 같다.

Filter paper 효소액으로 사용한 분획 S IV는 전 정제과정동안 약 10 배의 정제도를 보였고,

CMC 분해활성 분획(S III)과 β -glucosidase 활성 분획(S I)은 각각 47 배, 38 배의 정제도를 보였으며 이상의 분획들을 각 효소의 일반 성질을 검토하기 위한 부분 정제 효소시료로써 사용하였다. 단, CMC 분해효소의 경우 분획 S II가 S III보다 높은 효소활성을 나타내었으나 β -glucosidase 활성을 나타내는 단백질이 많이 혼입되어 있어 부득이 S III를 CMC 분해효소 시료로 사용하였다.

3. 各 酵素의 一般性質

1) 효소활성에 미치는 pH의 영향

각 효소활성에 미치는 pH의 영향은 pH가 각기 다른 완충액을 이용 측정하였는바, 그 결과는 Fig. 4와 같다.

세 효소 공히 pH 4에서 최대 활성을 나타내었으나, filter paper 및 CMC 분해효소의 경우 넓은 범위의 pH에서도 높은 활성을 보인 반면 β -glucosidase 는 pH 변화에 민감한 특성을 보였다.

2) 효소활성에 미치는 온도의 영향

효소반응액의 pH를 0.1 M Na-acetate buffer (pH 4.0)으로 조절한 다음 반응온도를 달리하여 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

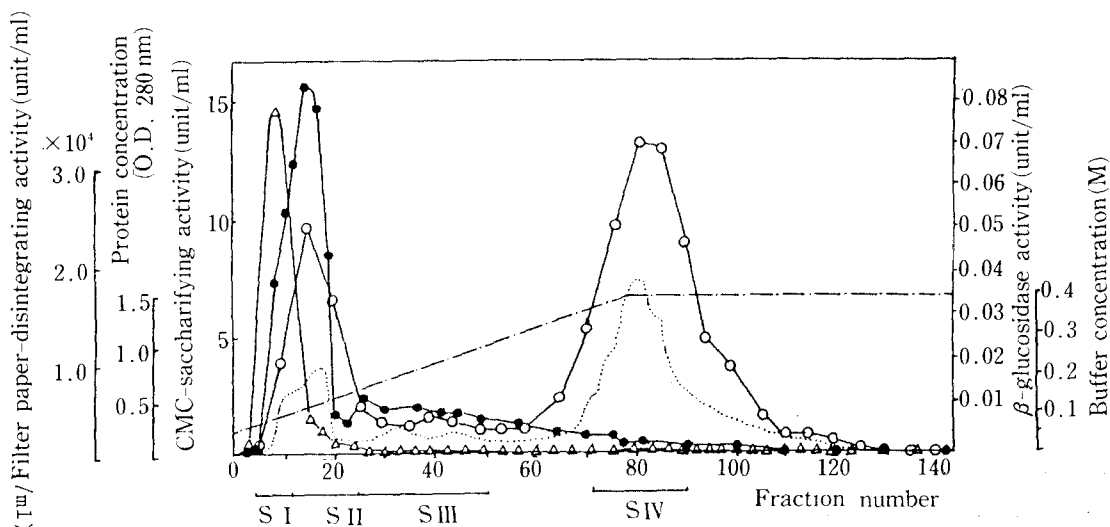


Fig. 3. Elution pattern of cellulase complex on DEAE Sephadex A-50 column chromatography.
 ···, Protein concentration (O.D. 280 nm) ; Δ , β -glucosidase activity (unit/ml) ; \bullet , CMC-saccharifying activity (unit/ml) ; \circ , Filter paper-disintegrating activity (unit/ml) ;
 ---, Buffer concentration (M)
 S I ; fraction No. 4-11 S III ; fraction No. 25-50
 S II ; fraction No. 12-14 S IV ; fraction No. 72-90

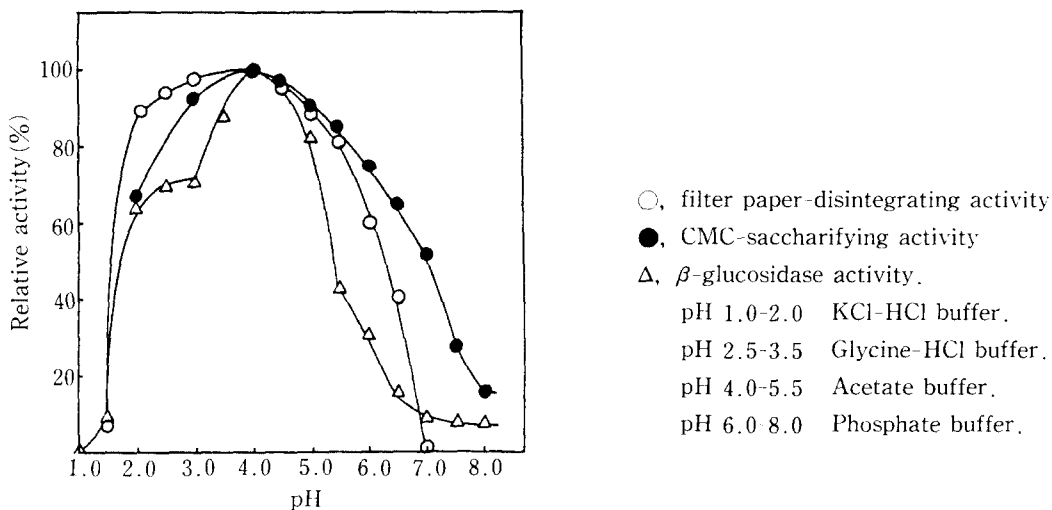


Fig. 4. Effect of pH on cellulase activities

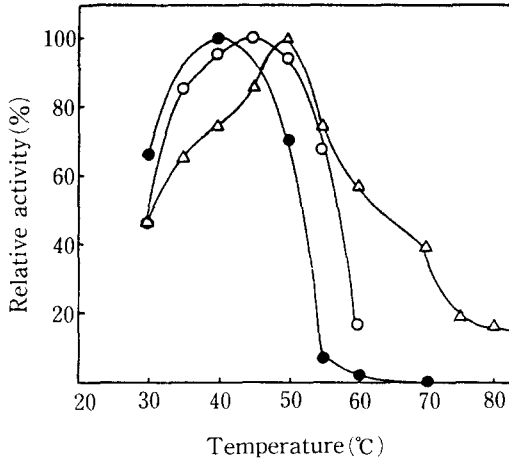


Fig. 5. Effect of temperature on cellulase activities.

- , filter paper-disintegrating activity ;
- , CMC-saccharifying activity ;
- △, β -glucosidase activity

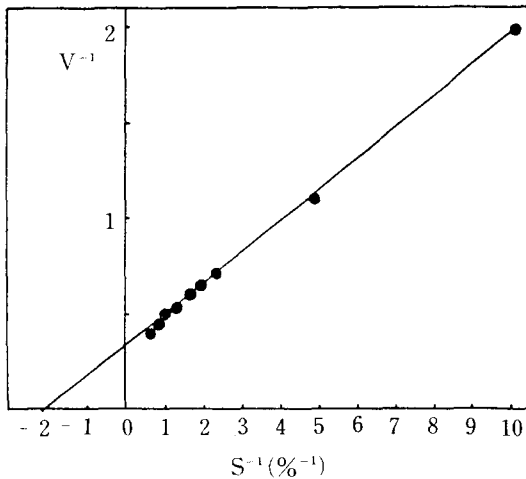


Fig. 6. Determination of Michaelis constant of CMC-saccharifying activity fraction.

The value was calculated from Lineweaver-Burk plots.

The formation of reducing sugar as unit/ml (measured at 640 nm) during the period of 30 min is presented by velocity (V).

그림에서 보는 바와 같이 CMC 분해활성은 40°C에서, filter paper 분해활성은 45°C에서, β -glucosidase 활성은 50°C에서 최고의 활성을 나타내었으며, 이후의 실험에서 상기조건을 온도를 각 효소의 최적온도로 하며 실험을 행하였다.

3) 효소활성에 미치는 기질농도의 효과

CMC 분해활성 및 β -glucosidase에 대하여 CMC와 OPNG를 각각의 기질로 하여 기질농도에 따른 효소활성을 측정(CMC 분해활성: 40°C, pH 4.0, β -glucosidase: 50°C, pH 4.0)하고 기질농도와 효소반응속도와의 관계를 Lineweaver-Burk's plotting하여 각 효소의 Michaelis constant(Km value)와 최대반응속도(Vmax)를 구한 결과, CMC에 대한 Km value는 0.485%, Vmax는 3.01(μ mole/min·ml)로 나타났으며(Fig. 6), β -glucosidase의 OPNG에 대한 Km value는 0.944×10^{-3} M, Vmax는 로 산출되었다(Fig. 7).

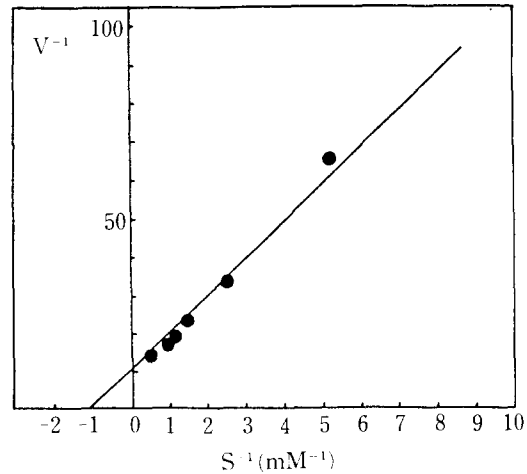


Fig. 7. Determination of Michaelis constant of β -glucosidase for ONPG.

The value was calculated from Lineweaver-Burk plots.

The formation of ONP as unit/ml (measured at 420 nm) during the assay period of 30 min is presented by velocity (V).

한편 filter-paper 분해효소에 대한 Km 는 실험기술 상 filter paper 를 기질로 사용할 수 없어 부득이 같은 결정상 cellulose 인 Avicel 을 기질로 사용하여 45°C pH 4.5 에서 효소반응을 시켜 구한 결과 Km 치는 0.980%, Vmax 는 0.178($\mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{ml}$)로 나타났다(Fig. 8).

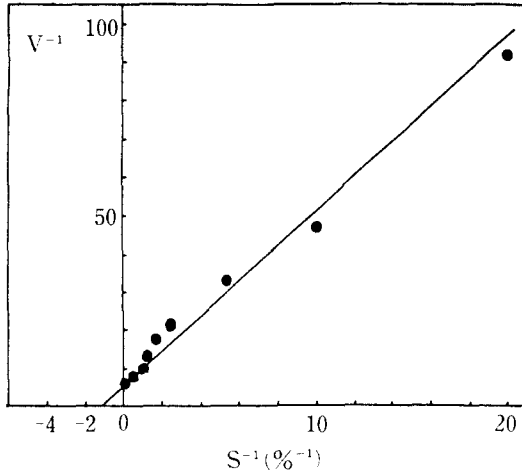


Fig. 8. Determination of Michaelis constant of C₁- component for Avicel.

The value was calculated from Lineweaver-Burk plots.

The formation of reducing sugar as unit/ml (measured at 540 nm) during the assay period of 2 hours is presented by velocity (V).

4) 효소활성에 미치는 반응생성물의 저해효과.

β -glucosidase 활성이 반응생성물인 glucose 에 의해 현저한 저해를 받는다는 것은 많은 연구보고로부터 이미 잘 알려져 있는 사실이다.

β -glucosidase 에 대한 glucose 저해 효과를 검토한 결과 Fig. 9 에 표시되어 있는 바와 같이 glucose 5 mM 이 존재할 때 ONPG 분해반응은 약 40% 저해됨을 보여 약한 저해효과를 나타냈으며, glucose 에 의한 β -glucosidase 의 저해양상은 Fig. 10 에 보는 바와 같이 경쟁적 저해양상을 나타내었고 Ki value 는 3.54×10^{-3} 으로 계산되었다.

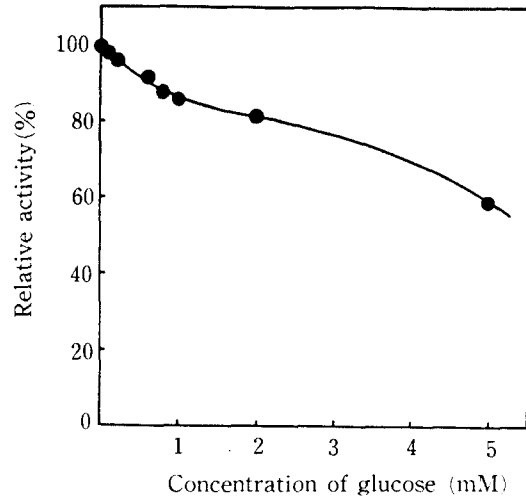


Fig. 9. Effect of glucose on β -glucosidase activity.

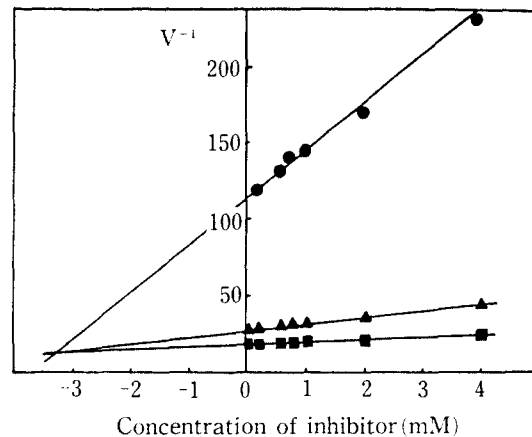


Fig. 10. Competitive inhibition of β -glucosidase fraction by glucose.

The values were calculated from Dixon plots. β -glucosidase fraction was incubated under the standard conditions of a constant amount of ONPG at 1.0(■), 0.5(▲), 0.1(●)mM. The formation of ONP as unit/ml (measured at 420 nm) during the assay period of 30 min is represented by velocity (V).

한편 CMC 분해활성에 미치는 cellobiose 효과 역시 Fig. 11에서 처럼 예상대로 뚜렷한 저해효과를 나타내었다.

따라서 본 효소를 이용한 실제 cellulose의 분해에 있어서 보다 효과적인 한 방법은 상기 반응생성물에 의한 효소의 저해현상을 제거하는 일이라고 생각되었다.

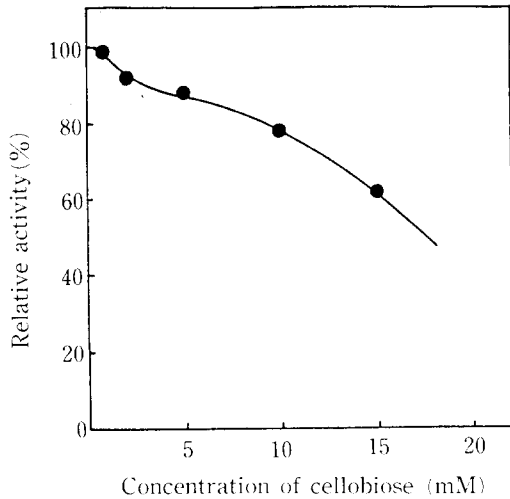


Fig. 11. Effect of cellobiose on CMC saccharifying activity

IV. 요약

Trichoderma viride QM 9414 cellulase의 생산 및 실제응용을 위한 기초자료를 얻고자 본 효소의 몇가지 성질을 검토하였다.

T. viride QM 9414를 밀키울 배지에 배양시 filter-paper 분해활성과 CMC 분해활성은 균체중식과 함께 배양 6일까지 증가하였으나 7일 이후 CMC 분해활성은 거의 일정수준을 유지한 반면 filter-paper 분해활성은 급격히 감소하였다.

β glucosidase 활성은 배양 8일까지 완만하게 감소하다가 이후 급격히 감소하였다.

한편 조 cellulase액을 ammonium sulfate (20~70%)로 분획, Sephadex G-200에 의한 gel 여과, DEAE Sephadex A-50을 이용하여 부분정제한 결과, filter-paper 분해활성, CMC

분해활성 및 β -glucosidase 활성을 각각 10 배, 47 배, 38 배로 정제하였다.

本 cellulase는 filter paper 분해활성, CMC 분해활성 및 β -glucosidase 활성을 나타내는 3가지 서로 다른 효소단백질의 복합체로 나타났으며, 각 효소의 반응 최적 pH는 모두 4.0이었고, 반응 최적온도는 CMC 분해효소 40°C, filter paper 분해효소 45°C 그리고 β -glucosidase 활성이 50°C로 나타났다.

CMC 분해활성의 CMC에 대한 Km치와 Vmax는 각각 0.485%, 3.01(μ mole/min·ml)이었으며, β -glucosidase의 ONPG에 대한 Km치 및 Vmax치는 0.944×10^{-3} M과 0.097(μ mole/min·ml)이었다.

Filter paper 분해활성의 Avicel에 대한 Km치 및 Vmax치는 0.90%와 0.178(μ mole/min·ml)로 산정되었다.

또한 β glucosidase는 glucose에 대해 경쟁적으로 저해현상을 나타내었으며 이때 Km치는 3.54×10^{-3} M이었다.

한편 CMC 분해효소는 cellobiose에 뚜렷한 활성 저해현상을 나타내었다.

V. 참고문헌

1. Mandels, M., Hontz, L. and Nystom, J. : *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1471 (1974).
2. Spano, L.A., Madeiros, J. and Mandelis, M. : Us Army Natick Laboratories. (1975).
3. Ryu, D. Y and Mandels, M. : *Enzyme Microb. Technol.* **2**, 91. (1980).
4. Mandels, M., Kostik, J. and Parizek, R. : *J. Polymer Sci.*, **36**, 445. (1971).
5. Savarese, J. and Young, S. D. : *Biotech. Bioeng.*, **20**, 1291. (1971)..
6. Wilkie, C.R., Young, R.D. and Stockar, U. V. : *Biotech. Bioeng.*

- Symp.*, **6**, 155. (1976).
7. Reese, E.T., Sie, R.G.H. and Levinson, H. S. : *J. Bacteriol.*, **59**, 485. (1950).
 8. Halliwell, G : *Biochem. J.*, **85**, 62. (1962).
 9. King, K.W. : *J. Ferment. Technol.*, **43**, 79. (1965).
 10. Selby, K. and Maitland, C.C. : *Biochem. J.*, **104**, 716. (1967).
 11. Wood, T.M., McCrae S. I. and Macgarlane : *Biochem. J.*, **189**, 51. (1980).
 12. Mandels, M. and Reese, E.T. : *J. Bacteriol.*, **79**, 816. (1960).
 13. Tangnu, S. K., Blanch, H.W. and Wilke, C.R. : *Biotech. Bioeng.*, **23**, 1837. (1981).
 14. Parry, J. B., Stewart, J. C. and Heptinstall : *Biochem. J.* **213**, 437. (1983).
 15. Takao, S., Kamagata, Y. and Sasaki, H. : *J. Ferment. Technol.*, **63**, 127. (1985).
 16. Suga, Y., Kawai, M. and Samehima, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 347. (1978).
 17. Maria, C. and Loureiro, D. : *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 744. (1982).
 18. Yoshioka, H. and Hayashida, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1729. (1980).
 19. Johnson, E.A., Sakajoh, H., Madia, A. and Demain A. L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1125. (1982).
 20. Stoppok, W., Papp, P. and Wagner, F. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 44. (1982).
 21. Hwang, J. T. and Hiroshi, G. : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2169. (1976).
 22. Chen, W.P., Anderson, A. W. and Han, Y.W. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 324. (1979).
 23. Morera, A. R., Phillips, J. A. and Humphrey, A. E. : *Biotech. Bioeng.*, **23**, 1339. (1981).
 24. Mandels, M. and Andreotti, R. E. : *Press Biochemistry*, **6**, (1978).
 25. Montencourt, B.S. and Eveleigh, D. E. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 178. (1977).
 26. 北御門敬之·外山信男 : 醸工., 40-2, 85. (1962).
 27. Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19. (1952).
 28. Nelson, N. : *J. Biol. Chem.*, **153**, 375. (1952).
 29. Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. : *Anal. Biochem.*, **2**, 127. (1960).
 30. Miller, G. L. : *Anal. Chem.*, **31**, 426. (1959).
 31. Okada, G. : *J. Biochem.*, **77**, 33. (1975).
 32. Duerkson, J.D. and Halvonson, H. : *J. Biol. Chem.*, **233**, 1113. (1958).
 33. Berghem, L. E. R. and Petterson, L. G. : *Eur. J. Biochem.*, **46**, 295. (1974).
 34. Gong, C. S., Ladish, M. R. and Tsao, G. T. : *Biotech. Bioeng.*, **19**, 959. (1977).
 35. Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr A. L. and Roudall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265. (1951).
 36. Huh, T. L. and Lee, S. Y. : *Korean Biochem. J.* **1**, 55. (1981).