

Avicelase 생산성 *Trichoderma* sp. HK 47의 분리 및 동정

박헌국·이계호*

동남보건전문대학 식품영양과, *서울대학교 식품공학과

Isolation and Identification of *Trichoderma* sp. HK 47 Producing Avicelase

Heon-Kuk Park and Ke-Ho Lee*

Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract

In order to obtain a good microorganism capable of degrading microcrystalline cellulose (avicel), the screening test was carried out from soil and brown-rot wood. 8 strains which had good avicel-hydrolyzing activity were isolated. Among them, HK 47 which exhibited the highest avicel hydrolyzing activity was identified as *Trichoderma* sp. HK 47. Maximum avicel-hydrolyzing enzyme production from *Trichoderma* sp. HK 47 was obtained with the optimum medium contained carboxymethylcellulose 1.5% as carbon source, NaNO₃ 0.75% as nitrogen source, KH₂PO₄ 0.5%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%, Tween 80 0.005% (V/V) during stationary cultivation at pH 6.0, 30°C. In this case, the production of avicel-hydrolyzing enzyme was 0.028 U/ml.

Key words : *Trichoderma* sp. HK 47, avicelase, screening

서론

인구의 증가와 제한된 화석 자원으로 인하여 식량 및 energy 자원의 부족 현상이 나타남에 따라서 새로운 자원 및 대체 energy를 개발하려는 연구가 절실히 요구되고 있다.

지구상에서 생산되는 biomass의 총량은 약 2,000억 톤 내외로서, 이 중의 거의 절반 이상이 cellulose이다. 이 cellulose를 당화시켜 발효성 당으로 전환하면 이들 발효성 당들로부터 single cell protein, ethanol, fructose, 기타 화학 물질들을 생산해 낼 수 있다. 그런데 cellulose로부터 발효성 당으로의 전환이 효율적이지 못하기 때문에 이용에 많은 제약과 받고 있으며, 이를 해결하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

1)

Cellulose는 anhydro-glucose unit가 $\beta(1\rightarrow4)$ 결

합된 homopolymer로서 중합도는 수 백에서 수 만까지 다양하게 존재하고 있다. 이들 cellulose 분자들은 서로 수소 결합을 하고 있어 결정성 구조를 나타내며 lignin 등에 둘러싸여 있기 때문에 섬유소를 효율적으로 이용하기 위해서는 탈 lignin을 위한 물리적, 화학적, 효소적인 lignin 분해 과정이 선행되어야 한다.^{2), 3)}

이렇게 탈 lignin 등의 전처리를 통하여 얻어진 cellulose는 산 또는 알카리 처리에 의한 가수 분해 방법과 미생물 효소를 이용하여 당화시키는 방법에 의하여 발효성 당으로의 전환이 가능하다. 그러나 전자의 경우 최종 산물의 분해 또는 역합성, 비섬유소 물질과 화학 물질과의 반응 및 사용 기구의 부식 등으로 인한 낮은 제품 수율, 낮은 순수도, 높은 설치 비용, 높은 생산 비용 등의 단점 때문에 효소에 의한 당화법에 더 큰 관심이 모아지고 있다.

섬유소 분해 효소는 endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase의 혼합물이라고 알려져 있으며, 이들 효소들의 상승 작용 (synergistic effect)에

의하여 불용성의 cellulose가 가수분해된다.⁴⁾ Endoglucanase[1, 4-(1,3;1,4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolase, Cx enzyme, E.C.3.2.1.4]는 cellulose분자에 무작위로 작용하여 glucose, cellobiose, cellotriose 등을 생성한다. Exoglucanase에는 2가지의 효소가 존재하며 그 하나는 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase (C₁ enzyme, avicelase, E.C.3.2.1.91)로서 cellulose chain의 비환원성 말단으로부터 cellobiose 단위로 분해하며, 다른 하나는 1,4- β -D-glucan glucohydrolase로서 cellulose chain의 비환원성 말단으로부터 glucose 단위로 분해한다. β -glucosidase에는 cellobiose, cellodextrins에 작용하여 glucose로 분해하는 β -D-glucoside glucohydrolase와 cellobiose에만 작용하는 true cellobiase가 있다.

Cellulase complex를 생산하는 미생물로는 *Trichoderma*⁵⁻⁸⁾, *Sporotrichum*⁹⁾, *Penicillium*¹⁰⁻¹³⁾, *Aspergillus*^{6, 8, 14-18)}, *Polyporus*¹¹⁾, *Fusarium*^{19, 20)}, *Sclerotium*¹⁾, *Eupenicillium*^{21, 22)}, *Schizophyllum*¹⁾속 등의 곰팡이류와 *Clostridium*²³⁾, *Thermomonospora*¹⁾, *Cellulomonas*²⁴⁻²⁷⁾, *Streptomyces*^{1, 28)}, *Bacillus*²⁹⁾, *Ruminococcus*³⁰⁾속 등의 세균류가 알려져 있다.

그러나, 이들 미생물들에 의한 cellulase의 생산량과 그 성질이 cellulose 당화에 충분하지 못하기 때문에 보다 강력한 cellulose 분해 효소 생산 미생물의 분리, 돌연 변이와 세포 융합 및 유전자 조합 등에 의한 미생물의 개량, 효소 생산을 최적화 하기 위한 발효 공학적 연구 등이 진행되고 있다¹⁾.

본 실험에서는 cellulose 분해 반응 초기에 관여하여 반응 속도에 크게 영향을 미치는 exoglucanase 역가가 우수한 균주를 분리하여 동정하고, 효소 생산 조건을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 균주 분리원

전국 각지에서 채취한 토양과 목재의 부식 부위를 avicel 분해성 균주의 분리에 사용하였다.

2. 배지

Avicel 분해성 균주의 분리용 배지로는 탄소원으로 avicel 만을 넣은 Table 1의 배지를 사용하였다.

Table 1. Composition of the medium for screening

Components	Amount
Avicel	0.2 g
NaNO ₃	0.1 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
Distilled water	1 l

The final pH was adjusted to 5.0.

In case of agar medium, 15 g of agar was added.

분리한 균주들은 bacteria의 경우 nutrient agar, fungi의 경우 potato dextrose agar에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Avicel 분해 효소 생산을 위한 기본 배지의 조성은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of the basal medium for enzyme production

Components	Amount
Avicel	1.5 g
NaNO ₃	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 g
Distilled water	1 l

The final pH was adjusted to 5.0.

3. Avicel 분해 균주의 분리

1) 1차 분리

토양의 경우 풍건하여 0.5g에 멸균수 5mℓ를 가하여 격렬히 교반 현탁시킨 후 정치하여 상등액을 적당 배수 희석하고, 목재의 경우 목재 적당량을 Tween 80을 0.05% (V/V) 가한 멸균수에 넣고 5분간 격렬히 교반하여 적당 배수 희석하였다. 희석된 sample 용액을 200 μ ℓ 씩 pour-plating 하여 30 $^{\circ}$ C에서 7~15일간 배양하면서 주위에 clear zone을 생성하는 미생물을

분리하였다.

2) 2차 분리

액체 배지 10ml가 들어 있는 test tube에 각 strain을 1 백금이 접종하고, 30℃로 48 시간 reciprocal shaker에서 60rpm 으로 교반하면서 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액의 효소 역가를 비교하여 우수 균주를 분리하였다.

3) 3차 분리

액체 배지 100 ml가 들어있는 500ml 삼각 플라스크에 분리된 각 strain을 1백금이 접종하고 30℃로 5 일간 reciprocal shaker 에서 60rpm으로 교반하면서 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 상등액의 효소 역가를 비교하여 우수한 균주를 분리하였다.

4. 분리 균주의 동정

분리된 균주의 동정은 “Mould and filamentous fungi in technical microbiology³²⁾” 와 “The fungi : An advanced treatise³¹⁾” 에 준하여 형태학적, 배양학적 특성을 확인하고 대조함으로써 동정하였다.

5. Avicel 가수 분해 역가의 측정

Avicel 가수 분해 역가는 Sawao Murao등¹⁶⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 0.02M acetate buffer (pH 5.0)의 1% avicel suspension 1ml 에 배양액의 원심 분리 상등액 1ml를 가하고 37℃에서 60 rpm으로 교반하면서 100분간 반응시키고 100℃에서 5분간 끓임으로써 반응을 정지시켰다. 반응액을 원심 분리하고 상등액 중의 유리 환원당을 DNS 변법³¹⁾으로 정량하였다.

이 때, 효소 1 unit는 주어진 조건 하에서 1분당 1 μ mole의 환원당을 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

1 Avicel 가수 분해 균주의 분리 및 선발

1) 1차 선발

전국 각지에서 채집한 부식 토양과 목재 부식 부위 시료에 대해서 screening test를 실시한 결과 clear

zone을 형성하는 균주 60여종을 1차 선발하여 순수 분리하였다.

2) 2차 선발

1차 선발된 균주를 가지고 2차 선발을 시행한 결과 8종의 균주가 비교적 높은 avicel 가수 분해 효소를 생

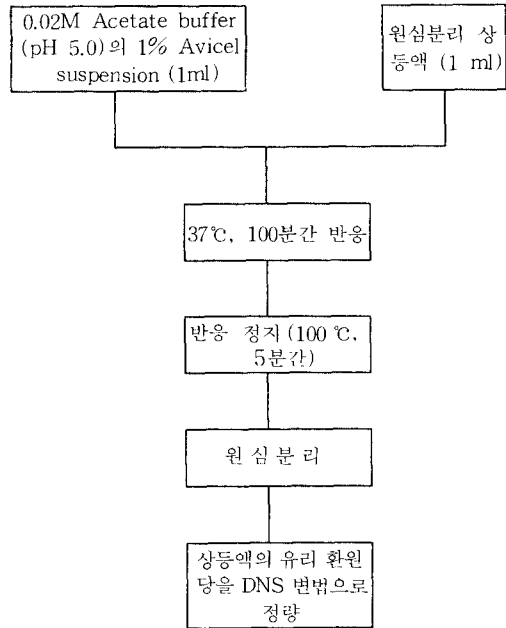


Fig. 1. Schematic diagram of measurement of avicel-hydrolyzing activity.

Table 3. Comparison of the avicel-hydrolyzing activity of isolated microorganisms

Microorganism	Activity (U/ml)
<i>T. reesei</i>	0.0048
HK 3	0.0048
HK 7	0.0056
HK 15	0.0060
HK 19	0.0056
HK 26	0.0060
HK 39	0.0040
HK 44	0.0040
HK 47	0.0071

산하는 것으로 나타났으므로 정량적인 실험을 위하여 3차 선발을 실시하였다.

3) 3차 선발

분리 선발한 8균주와 avicel 가수 분해 역가가 높은 것으로 알려져 있는 *Trichoderma reesei* QM9414를 효

소 생산 기본 배지에서 배양하여 원심 분리 상등액의 avicel 분해 효소 역가를 측정한 결과 Table 3에서 보여주는 바와 같이 avicel 분해력이 가장 우수한 HK 47을 최종적으로 선발할 수 있었다.

2. 분리 균주 HK 47의 동정

최종 선발된 HK 47을 PDA배지에 계대 보관하였을 때와 Czapek agar에 배양하였을 때의 모양은 전형적인 진정균류의 모습을 나타내었으며, 유주자가 존재하지 않고 perfect state가 발견되지 않는 등의 사실로부터 *Deuteromycotina*에 속하는 균주임을 알 수 있었다. 또한, *Deuteromycotina* 중에서도 mycelium이 잘 발달되어 있고 분생자병을 형성하여 끝에 분생자를 착생하는 것으로 보아 *Hyphomycetes* 강에 속하는 균주임을 알 수 있었다. 분생자병의 끝이 플라스크형의 phialide를 형성하고 mucous cell wall을 갖는

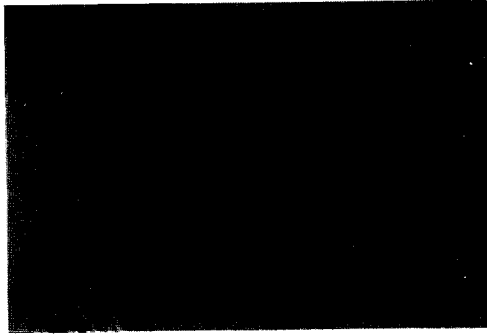


Fig. 2. Mycelium and spores of *Trichoderma* sp. HK 47.

Table 4. Identification keys of fungi

Key to divisions of Fungi	
1'. Plasmodium or pseudoplasmodium absent, assimilative phase typically filamentous	Eumycota
Key to subdivisions of Eumycota	
1'. Motile cells absent.	2
2'. Perfect state absent	<i>Deuteromycotina</i>
Key to classes of <i>Deuteromycotina</i>	
1'. Mycelium well-developed, assimilative budding cells absent	2
2. Mycelium sterile or bearing spores directly or on special branches (sporophores) which may be variously aggregated but not in pycnidia or acervuli	<i>Hyphomycetes</i>
Key to genera of Hyphomycetes	
1. Fungi producing only arthrospores	<i>Geotrichum</i>
1'. Fungi producing other spore types	2
2. Fungi producing aleuriospores	3
2'. Fungi producing other spore types	8
8. Fungi producing sympodulospores	9
8'. Fungi producing other spore types	10
10. Fungi producing chains of annelospores occurring on annelids	<i>Scopulariopsis</i>
10'. Fungi producing other types	11
11. Fungi producing blastospores or botryoblastospores	12
11'. Fungi producing phialospores	14
14. Phialospores showing mucous cell walls occurring either in short chain or small balls	15
15'. Phialides arising in whorls	16
16. Phialides short, flask-shaped occurring in poorly developed whorls	<i>Trichoderma</i>

phialospore를 형성하고 있으며, 배양 초기에는 흰색 colony를 형성한 뒤 옅은 녹색의 spore를 형성하였다가 점차로 진한 녹색으로 변하며 특유의 coco-nut odour를 나타내는 사실 등을 종합하여 분리한 균 HK 47을 *Trichoderma* sp. HK 47로 동정하였다.

3. *Trichoderma* sp. HK 47의 효소 생산 조건

1) 통기 교반의 영향

통기 교반의 효과를 검토하기 위하여 정치 배양과 진탕 배양 (60strokes /min) 시의 효소 생산성을 비교한 결과는 Table 5 에서와 같이 정치 배양의 경우가 avicel 분해 효소의 생성에 더 유리하였다.

Table 5. Effect of agitation on avicel-hydrolyzing enzyme production

Culture	Activity (U /ml)
Submerged culture	0.0111
Shaking(60rpm)	0.0079

2) 배양 온도의 영향

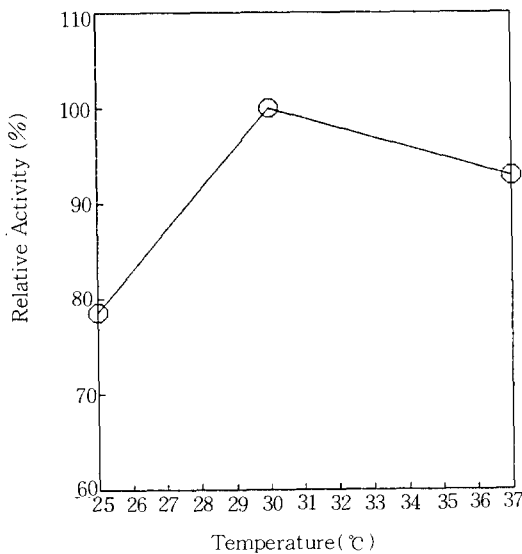


Fig. 3. Effect of culturing temperature on avicel-hydrolyzing enzyme production.

Trichoderma sp. HK 47 의 배양 온도에 따른 효소 생산성을 알아보기 위하여 효소 생산 기본 배지에서 각각 25°C, 30°C, 37°C로 배양한 결과는 Figure 3 에서와 같이 30°C에서 avicel 가수 분해 효소의 최대 생성을 나타내었다. 이는 Sawao 등¹⁰⁾이 발표한 *Aspergillus aculeatus* F-50에서의 결과와 일치하였다.

3) 초기 배지 pH의 영향

효소 생산에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 배지의 초기 pH를 HCl과 NaOH를 이용하여 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 맞추고 배양한 결과는 Figure 4 에서와 같이 pH 6.0 에서 avicel 가수 분해 효소의 최대 생산을 나타내었다. 이는 Sawao 등¹⁰⁾이 *Aspergillus aculeatus* F-50으로 실시한 실험결과에서 pH 5~7에서는 큰 영향을 받지 않았다는 결과와는 상이한 결과를 나타내었다.

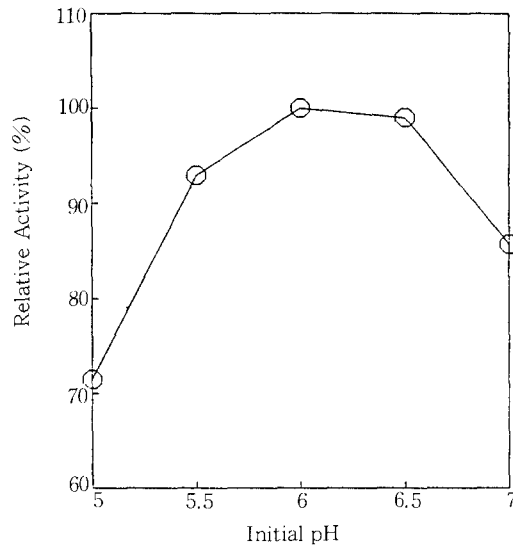


Fig. 4. Effect of initial pH of media on avicel-hydrolyzing enzyme production

4) 탄소원의 영향

Table 2 의 효소 생산 기본 배지에서 탄소원의 종류를 바꾸면서 탄소원에 따른 효소 생산량을 비교한 결과는 Table 6 과 같았다. CM-cellulose와 avicel을 사용한 경우가 효소 생산량이 많았으며 oligosacch-

Table 6. Effect of the carbon sources on avicel-hydrolyzing enzyme production

Carbon sources	Activity(U/ml)
None	—
Filter paper	0.0071
CM-cellulose	0.0262
Avicel SF	0.0111
Cellulose powder	0.0024
α -cellulose	0.0079
Soluble starch	0.0079
Dextrin	0.0024
Cellobiose	—
Glucose	—
Lactose	—

arides를 사용한 경우는 균체의 생장은 있었지만 효소는 생산되지 않았다. 따라서 CM-cellulose와 avicel이 효소 생산을 inducing 하는 것으로 생각되었는데, 이는 Sawao Murao 등¹⁶⁾의 결과와 일치하였다.

효소 생산성이 가장 우수하였던 CM-cellulose의 농도에 따른 효소 생산량을 비교한 결과는 Figure 5와 같이 1.5%에서 효소 생산량이 최대를 나타내었다.

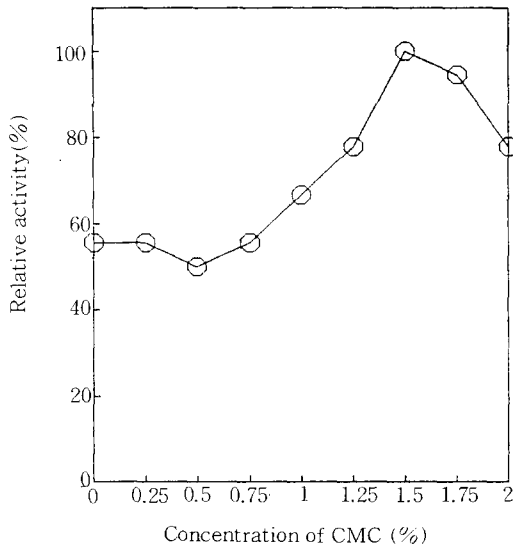


Fig. 5. Effect of carboxymethylcellulose concentration on avicel-hydrolyzing enzyme production.

5) 질소원의 영향

Table 2의 효소 생산 기본 배지에서 질소원의 종류를 바꾸면서 질소원에 따른 효소 생산량을 비교한 결과는 Table 7과 같았다. 일반적으로 유기 질소원에 비하여 무기 질소원의 경우가 높은 효소 생산량을 나타내었으며, 그 중에서도 NaNO_3 가 가장 높은 효소 생산량을 보여주었다.

Table 7. Effect of the nitrogen sources on avicel-hydrolyzing enzyme production

Nitrogen sources	Activity(U/ml)
None	—
Yeast extract	0.0063
Peptone	—
Malt extract	—
Casein	—
Casamino acid	—
Urea	0.0031
NaNO_3	0.0111
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{SO}_4$	0.0071
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.0063
NH_4NO_3	0.0087
KNO_3	0.0087

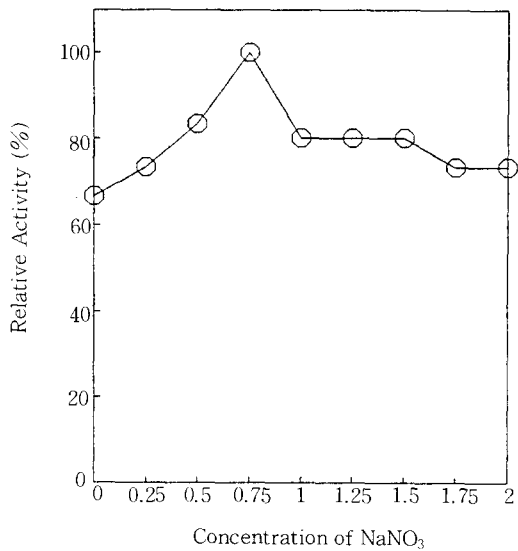


Fig. 6. Effect of NaNO_3 concentration on avicel-hydrolyzing enzyme production

효소 생산성이 가장 우수하였던 NaNO_3 의 농도에 따른 효소 생산량을 비교한 결과는 Figure 6과 같이 0.75%에서 효소 생산량이 최대를 나타내었다.

6) 인산염의 영향

인산염의 농도에 따른 효소 생산량을 비교한 결과는 Figure 7과 같이 0.5%의 경우가 최대의 효소 생산량을 나타내었다.

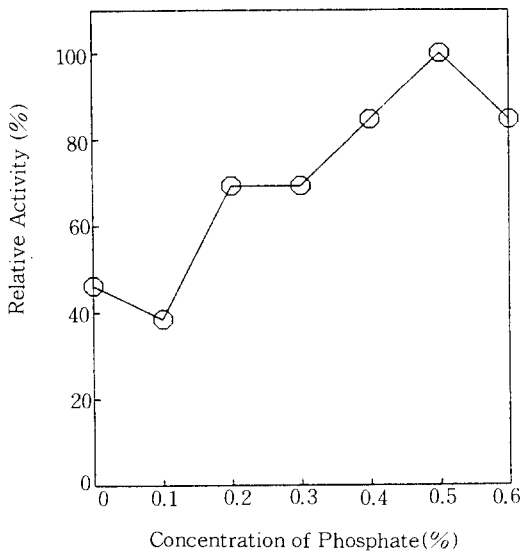


Fig. 7. Effect of phosphate concentration on avicel-hydrolyzing enzyme production.

7) 무기 염류의 영향

효소 생산 기본 배지에 FeSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , CuSO_4 를 0.0001% 되게 첨가하여 효소 생산량에 미치는 영향을 비교한 결과는 Table 8에서 보여 주는 바와 같이 이들 무기 염류들은 효소 생산에는 좋은 영향을 주지 못하였으며, 오히려 무기염류를 첨가하지 않은 control의 경우가 가장 높은 효소 생산을 보여주었다.

8) 계면 활성제의 영향

Extracellular enzyme의 생산량을 높여 주는 것으로 알려진 계면 활성제의 효과를 보기 위하여 Triton X-100 과 Tween 80 을 첨가하여 생성된 효소의 역할을 비교한 결과는 Table 9와 같았다.

Table 8. Effect of the mineral salts on avicel-hydrolyzing enzyme production

Salts	Activity(U/ml)
Control	0.0103
FeSO_4	0.0087
ZnSO_4	0.0071
MnSO_4	0.0095
CuSO_4	0.0079

Table 9. Effect of the surfactants on avicelhydrolyzing enzyme production

Surfactant	Dose(%)	Enzyme activity(U/ml)
Tween 80	0.05	0.0122
	0.10	0.0122
	0.15	0.0089
	0.20	0.0111
Triton X-100	0.10	0.0100

Tween 80의 경우 0.05~0.1%(V/V)에서 효소 생산을 증가시키는 것으로 나타났으며, Triton X-100의 경우는 오히려 효소 생산을 억제하는 것으로 나타났다.

9) *Trichoderma* sp. HK 47의 최적 효소 생산 조건

Trichoderma sp. HK 47의 avicelase 생산 최적 조건은 Table 10의 배지에서 30℃로 5일간 정지 배양하는 것이었으며, 그 때의 효소 생산량은 0.028 U/ml이었다.

Table 10. Composition of the medium for avicel-hydrolyzing enzyme production

Components	Amount
Carboxymethylcellulose	15g
NaNO_3	7.5g
KH_2PO_4	5.0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0g
Tween 80	0.5ml
Distilled water	1l

The final pH was adjusted to 6.0.

적 요

결정성 cellulose를 분해할 수 있는 효소를 생산하는 미생물을 얻기 위하여 토양과 갈색으로 부식된 목재 부위로부터 screening test를 행하였다. Avicel 분해능이 우수한 8종의 균주를 분리하였으며, 그 중에서 avicel 분해능이 가장 우수한 HK 47을 선정하여 형태학적 배양학적 특성을 확인함으로써 *Trichoderma* sp. HK 47 임을 동정하였다. 분리 선정 균주 *Trichoderma* sp. HK 47에 대하여 avicel 분해 효소 생산을 위한 배양 최적 조건을 조사하였다. 배지는 탄소원으로서는 carboxymethylcellulose 1.5%, 질소원으로서는 NaNO_3 0.75%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, Tween 80 0.05%(V/V), 무기염류는 첨가치 않는 것이 최적이었으며, 배양 조건으로서는 pH 6.0, 30℃에서 정치 배양하는 것이 최적이었다. 이 경우에 avicel 분해 효소의 생산량은 0.028 U/ml 이었다.

참고문헌

- Virendra, S. Bisaria and Tarun, K. Ghose : *Enzyme microb. Technol.* 3(2) 90 (1981)
- Fan, L.T. Lee, Y.H. and Beardmore, D.H. : in *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 14, pp.101-117, Springer Verlag, Heidelberg (1980)
- Chang, M. M. Chou, T. Y. C. and Tsao, G. T. : in *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 20, pp.15-42, Springer-Verlag, Heidelberg(1981)
- Ladisch, M. R. Lin, K. W. Voloch, M. and Tsao, G. T. : *Enzyme Microb. Technol.*, 5(2) 82 (1983)
- Kihaghiro Ogawa, Hideo Toyama, and Nobuo Toyama : *J. Ferment. Technol.*, 60(4) 349 (1982)
- Herr, D. Luck, G. and Dellweg, H. : *J. Ferment. Technol.*, 54(4) 273 (1978)
- Mishra, Saroj and Gopalkrishnan, K. S. : *J. Ferment. technol.*, 62(6) 495 (1984)
- Macris, B. J. and Galiotou-Panayotou, M. : *Enzyme Microb. Technol.*, 8(3) 141 (1986)
- Eriksson, K. E. : *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 317 (1978)
- Mala Rao, Chittra Mishra, Sushma Gaikward, and M. C. Srinivasan : *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 129 (1986)
- Lachke, A. H. Bastawde, K. B. Powar, V. K. and Srinivasan, M. C. : *Enzyme Microb. Technol.*, 8(2) 105 (1986)
- Tooru Funaguma, Haruhiko Tsuji, and Akoira Hara : *J. Ferment. Technol.*, 64(1) 77 (1986)
- Yoichi Kamagta, Hiroshi Sasaki, and Shioch Takao : *J. Ferment. Technol.*, 64(3) 211 (1986)
- Shisaku Hayashida, Kaiguo Mo, and Akira Hosoda : *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(6) 1523 (1988)
- Paramjit S. Bagga and Dhanwant K. Sandhu : *J. Ferment. Technol.*, 65(6) 635 (1987)
- Sawao Murao, Jinshu Kanamoto, and Motoo Arai : *J. Ferment. Technol.*, 57(3) 151 (1979)
- Reiichiro Sakamoto, Motoo Arai, and Sawao Murao : *J. Ferment. Technol.*, 62(6) 561 (1984)
- Sawao Murao, Reiichiro Sakamoto, and Motoo Arai : *Agric. Biol. Chem.*, 49(12) 3511 (1985)
- Chitra Mishra, Madhavi Vaidya, Mala Rao and Vasanti Deshpande : *Enzyme Microb. Technol.*, 5(6) 430 (1983)
- Thomas M. Wood and Sheila I. McCrae : *Carbohydrate Research*, 57, 117 (1977)
- Mitsuo Tanaka, Masayuki Taniguchi, Ryuichi Matsuno, and Tadashi Kamikubo : *J. Ferment. Technol.*, 58(2) 149 (1980)
- Mitsuo Tanaka, Masayuki Taniguchi, Ryuichi Matsuno, and Kamikubo : *J. Ferment. Technol.*, 59(3) 177 (1981)

23. Weimer, P. J. and Zeikus, J. G. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**(2) 289 (1977)
24. Amtul Jamil Sami, M. Waheed Akhtar, Nadeem Nawazish Nalik and Bashir Ahmad Naz : *Enzyme Microb. Technol.*, **10**(10) 626 (1988)
25. Ke-Ho Lee and Chan-Yong Lee : *Agric. Res. of Seoul Nat'l Univ.* : **10**(2) 19 (1985)
26. Katsumi Nakamura and Kumpei Kitamura : *J. Ferment. Technol.*, **60**(4) 343 (1982)
27. Katsumi NaKamura and Kumpei Kiramura : *J. Ferment. Technol.*, **61**(4) 379 (1983)
28. Ishaque, M. and Kluepfel, D. : *Can. J. Microbiol.*, **26**(2) 183 (1980)
29. Robson L. M. Chambliss, G. H. : *J. Bacteriol.*, **165**, 612 (1986)
30. Taya, M. Ohmiya, K. Kobayashi, T. : *J. Ferment. Technol.*, **58**, 463 (1980)
31. Gail Lorenz Miller : *Anal. Chem.*, **31**(3) 426 (1959)
32. Olga Fassativo : in *Mould and filamentous fungi in technical microbiology* (Progress in industrial microbiology ; Vol. 22), Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1986)
33. Ainsworth , G. C., Sparrow, F. K., Sussman, A. S . : in *The Fungi ; An Advanced Treatise* Vol. IVA, Academic Press, New York (1973)

(1993년 8월 18일 수리)