

반응표면분석에 의한 방선균 *Streptomyces chibaensis* J-59 포도당 이성화효소의 생산 최적화

주길재 · 박희동*

경북대학교 농화학과, 식품공학과*

Optimizing Conditions for *Streptomyces chibaensis* J-59 Glucose
Isomerase Production Using Response Surface Methodology

Gil-Jae JOO · Heui-Dong PARK*

Dep. of Agricultural Chemistry, Dep. of Food Science and Technology*
Kyungpook National University

Abstract

Using response surface methodology(RSM), the various conditions(agitation speed, air flow, glucose concentration) in jar fermentor culture were investigated to find the optimum conditions for maximum enzyme production. Central-composite-design was used to control the variable constant in the experiment. The glucose isomerase production of *Streptomyces chibaensis* J-59 was mostly affected by the air flow rate and glucose concentration. The estimated optimum conditions were as follows: 1% birchwood xylan, 1.5% CSL, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.012% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, pH 7.0; air flow, 2.2vvm; agitation speed, 587rpm; glucose concentration, 0.586%. Experimental values(7.43GIU/*ml*) for the enzyme production obtained from the given optimum conditions had a almost resemblance to response values(7.67GIU/*ml*) predicted by the RSM. The jar fermentor culture by the RSM produced xylose isomerase about 2.7 times as much as the baffled flask culture.

Key words: *Streptomyces chibaensis*, glucose isomerase, response surface methodology

I. 서론

D-Xylose isomerase(D-xylose ketol-isomerase; E.C. 5. 3. 1. 5)는 xylose를 xylulose로 이성화시키며 동시에 glucose를 fructose로 전환시킬 수 있기 때문에 포도당 이성화효소(glucose isomerase)라고도 한다(Chen et al., 1980). 포도당 이성화효소는 1957년 Marshall과 Kooi (1957)가 *Pseudomonas hydrophila*에서 처음 발견한 후 많은 연구자들에 의해 이성화당(isomerized sugar: high-fructose glucose syrup, HFGS; 포도당 과당 시럽) 생산에 크게 기여하였고(Bucke, 1981), 오늘날 전분공업 발달에 중요한 역할을 담당하고 있다. 그러나 아직 효소의 내열성 증대 및 효소생산의 원가절감 등 몇가지 해결해야 할 문제들이 남아있는 실정이다. 이러한 측면에서 본인 등은 내열성이 우수한 포도당 이성화효소를 생산하는 방선균 *Streptomyces chibaensis* J-59를 분리 동정하였고(주 등, 1997a), 균주의 특성을 조사하여 플라스크배양에서의 포도당 이성화효소 생산 최적조건을 확립하였다(주 등, 1997b).

일반적으로 효소생산을 위한 미생물의 최적배양조건은 탄소원, 질소원, 금속이온, 배양시간, pH, 및 통기량 등과 같이 배양 요인 변수 중에서 한 변수를 제외한 나머지 변수들을 일정하게 하고 한 변수씩 차례로 변화시켜 최적 생산조건을 구하는 one-factor-at-time method가 적용되어 왔으며 포도당 이성화효소의 생산 최적조건도 이와같은 방법으로 얻어졌다(주 등, 1997b; Takasaki, 1966; Chen et al., 1979; Mand et al., 1977). 그러나 이러한 방법으로 설정된 조건으로는 실제 효소생산 최적조건이라 보기 어렵다. 따라서 통계학적 기법으로 잘 설계된 실험계획법에 따라 실험을 수행함으로써 구간실험의

어려움과 실험경비 및 시간 등의 원가를 절감시키고 요인별 상호작용도 관찰할수 있기 때문에 one-factor-at-time method로 찾아내기 힘든 true optimum condition을 구할 수 있다(박, 1991). 이러한 실험계획법은 식품의 분석법, 제품, 반응공정 등의개발에 많이 이용되고 있는 실정이며(Motycka et al., 1984; Giovanni, 1983; Henika, 1982), 그 대표적 방법으로 SAS(statistical analysis system)의 반응표면분석(response surface methodology, RSM; Myers, 1975)이 있다.

따라서 본 연구에서는 반응표면분석을 jar fermentor 배양에 적용하여 *Streptomyces chibaensis* J-59로 부터 포도당 이성화효소의 생산 최적화를 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 및 배지

공시균주는 *Streptomyces chibaensis* J-59(주 등, 1997a)를 사용하였으며, 배지는 플라스크배양에서의 효소생산 최적조건 배지인 CSL 배지(1% xylan, 0.15% glucose, 1.5% corn steep liquor, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.012% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, pH 7.0)(주 등, 1997b)를 기본배지로 사용하였다.

2. Jar fermentor 배양에서의 효소생산 및 요인선별

종배양은 500ml baffled flask에 CSL배지 200ml을 넣고 살균한 후 oatmeal agar 배지(4)에서 배양한 독립 colony를 접종하여 30℃에서 150rpm으로 42시간 배양하였다.

Jar fermentor(2.5 l, 한국발효기상사) 배

양은 상기 CSL배지 1 l 를 넣고 살균한 후 증배양액을 1% 되게 접종하고, 공기주입량(air flow)은 1vvm, 교반속도(agitation sped)는 200rpm으로 하여 28~32℃에서 48시간 배양하였다.

효소생산에 큰 영향을 미치게하는 3가지 요인을 선별하기 위하여 CSL배지에 탄소원, 질소원 및 금속이온 등의 농도를 변화시키거나 pH, 공기주입량, 교반속도 등을 변화시키며 배양한 후 효소생산력을 조사하여 선별하였다.

3. 효소활성의 측정

포도당 이성화효소 활성 측정은 Takasaki(1966)의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응액(50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0), 20mM MgSO₄ · 7H₂O, 200mM glucose) 1ml에 배양균체 현탁액(0.4g/ml) 1ml를 섞어 전체 반응액을 2ml로 하여 측정하거나 또는 배양균체 현탁액(0.4g/ml)을 90μA에서 5분 간격으로 4회 초음파 파쇄기(Ultrasonic 사)로 파쇄하고 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상정액 0.2ml를 상기 반응액 1ml에 첨가하고 증류수로 전체 반응액을 2ml가 되게하여 측정하는 2가지 방법을 병행하였다. 각각 반응액을 70oC에서 30분간 반응시킨 후 0.5M perchloric acid 2ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 생성된 fructose를 cysteine-carbazole 법(Dische et al., 1951)으로 560nm의 파장에서 정량하였다. 효소활성 단위는 국제단위(GIU)로 상기 반응조건에서 분당 1μmol의 fructose를 생산하는 효소의 양으로 나타내었다.

4. 균체량 측정

균체량은 Schmidell의 방법(Schmidell과 Fernandes, 1976)에 따라 분석하였다. 즉, NaOH 용액을 최종농도가 1M되게 균체 현

탁액에 첨가하여 100℃에서 30분간 가열하여 냉각원심한 후 상정액 ml 당 단백질량(mg)을 측정하여 균체량으로 나타내었다. 단백질은 소의 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 표준 단백질로 하여 Bradford 법(1976)에 따라 595nm에서 비색정량하거나 UV 280nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

5. 포도당 이성화효소 생산의 최적화 실험

Jar fermentor 배양에서 포도당 이성화효소 생산의 최적화를 확립하기 위하여 반응표면 분석을 이용하였고, 최적반응(optimum response)의 요인 변수(독립 변수, independent variables)는 효소생산에 큰 영향을 미치는 공기주입량(air flow, X₁), 교반속도(agitation speed, X₂), 포도당의 농도(glucose concentration, X₃)로 하였다. 각 요인변수의 반응조건들은 -1, 0, 1, 로서 3 단계로 부호화하였고 실험값은 표 1에 나타내었다. 중심합성계획(central composite design)에 따라 중심점의 수는 제한이 없이 하나 이상이며, 여기서는 두개의 중심점을 (0,0,0), (0,0,0)으로 설정하였다. 그리고 축점의 수는 반응조건이 세개이므로 여섯개의 축점으로 하였으며, 그리고 요인 실험점으로는 2³, 즉 여덟개의 요인 실험점으로 하였으며, 각각 요인 실험점은 (-1,-1,-1), (-1,-1,1), (-1,1,-1), (1,-1,-1), (-1,1,1), (1,-1,1), (1,1,-1), (1,1,1)로 설정하였다. 반응변수(response variable)는 효소활성으로 나타내었고, 이때 세가지 반응조건에 대한 2차 회귀모형(second order model)은 다음과 같다.

$$Y = (b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_{12} + b_{22}X_{22} + b_{33}X_{32})$$

여기서 Y는 반응변수로 효소 활성이며, X₁, X₂, X₃ 은 반응 조건, b₀은 절편, b_n는 회귀계

수이다. 반응표면이 올라가거나 내려가는 능선형태로 최적점을 규명하기 어려울 때는 능선분석(ridge analysis)을 사용하였고, 적합한 반응표면의 형태는 등고선도(contour plot)로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 효소생산에 미치는 요인선별

S. chibaensis J-59는 세포의 xylanase를 생산하므로 xylan을 xylooligo당 및 xylose로 분해하였고, 이 xylan 가수분해산물인 xylose는 포도당 이성화효소 생산의 유도물질로 작용하였다(주 등, 1997a). 따라서 유도물질로 비싼 xylose 대신 값싼 xylan으로 대체할 수 있었다. 또한 본 균주는 xylulokinase활성이 결여된 *xyIB* mutant이기 때문에 xylose를 탄소원 및 에너지원으로 이용하지 못하여 배지내에서 소모되지 않고 남아 있었다(주 등, 1997b). 따라서 본 균주는 xylan은 탄소원으로 사용할 수 없기 때문에 glucose를 탄소원으로 사용하였다. 플라스크배양에서는 0.15% glucose를 첨가하였으나(주 등, 1997b), jar fermentor 배양에서는 0.15%, 0.3%, 0.6% 및 0.9%로 변화시키면서 농도별로 첨가하여 균의 성장 및 효소의 생산을 조사하였다. 그 결과 균체의 성장은 포도당의 농도가 증가함에 따라 균체의 성장도 증가하였다. 그러나 포도당 이성화효소의 활성은 그림 1과 같이 포도당의 농도가 0.15%에서 0.3%로 증가할수록 효소 활성도 증가하였지만, glucose 농도가 0.6%와 0.9%일 경우에는 포도당에 의한 이화물 억제현상(catabolite repression effect)을 나타내어 배양 초기에는 효소활성이 떨어졌으나, 42시간 이후 부터는 0.3% glucose보다는

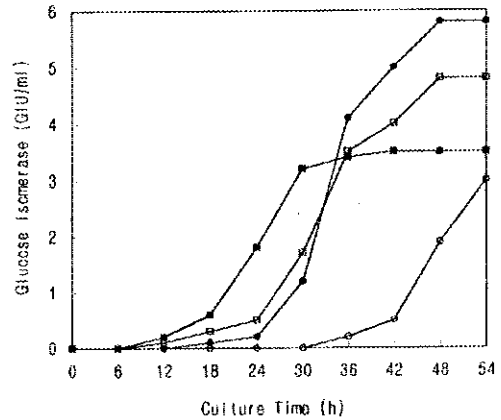


Fig. 1. Profiles of glucose isomerase production by the glucose concentration in jar fermentor culture. *S. chibaensis* J-59 was incubated in the CSL medium containing the various glucose concentration for 48h at 30°C. - , 0.15% glucose; - , 0.3% glucose; - , 0.6% glucose; - , 0.9% glucose.

0.6% glucose를 첨가한 배지에서 효소 활성이 오히려 높게 나타났다. 따라서 glucose 농도가 효소 생산에 큰 영향을 미치는 요인임을 확인하였다.

질소원으로 corn steep liquor(CSL)를 0.5% 단위로 1%에서 3%까지 농도별로, 금속이온으로 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 0.1% 단위로 0.1%에서 0.4%까지, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 0.01% 단위로 0.01%에서 0.03%까지 농도별로 첨가하여 균의 성장 및 효소의 생산을 조사한 결과, 플라스크배양과 거의 동일하게 CSL은 1.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 0.1%, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 는 0.01% 이상에서는 더 이상의 효소생산이 증가되지 않았다(데이터 미제시).

배지의 pH는 먼저 초기 pH 7.0으로 고정하여 배양이 끝날때 까지 7.0으로 조절한 경우, 초기 pH를 7.0으로 고정하여 배양중 pH 조절없이 그냥 두었을 경우, 초기 pH를 6.5로 고정하여 배양이 끝날때 까지 pH를 6.5로 유지한 경우, 초기 pH를 7.5로 고정하여 배양이 끝날때 까지 pH를 7.5로 유지한 경우 등 4가지 조건으로 나누어 균체 성장 및 포도당 이성화효소 생산 등을 조사한 결과, 포도당 이성화효소의 생산은 균체 성장과 비례하여 나타났으며, pH 7.0일때 가장 빠르게 생산하였으나 배양 36시간 이후에는 pH의 변화에 관계없이 포도당 이성화효소의 생산은 큰 영향이 나타나지 않았다(테이타 미제서).

S. chibaensis J-59는 호기성이라 삼각플라

스크보다 baffle이 달린 플라스크에서 효소생산이 우수하였다((주 등, 1997b). 따라서 jar fermentor 배양에서의 공기주입량을 1vvm에서 4vvm까지 1vvm 단위로 증가시키며 효소활성을 조사한 결과, 2vvm 이상에서는 모두 효소활성이 우수하였다(그림 2). 교반속도를 200rpm부터 800rpm까지 150rpm 단위로 포도당 이성화효소의 활성을 조사한 결과, 그림 3에서와 같이 rpm이 증가할 수록 효소활성도 증가하였으나 650rpm이상에서는 배양상의 문제로 활성이 감소하였다.

따라서 효소생산에 가장 큰 영향을 미치게 하는 인자로는 glucose의 농도, 공기주입량 및 교반속도로 각각 선별하였다.

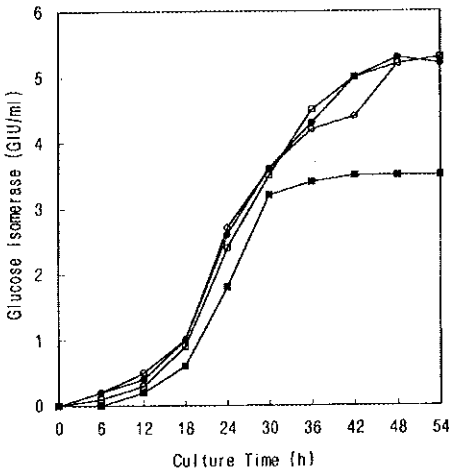


Fig. 2. Profils of glucose isomerase production by the air flow variation in jar fermentor culture. *S. chibaensis* J-59 was incubated in the CSL medium under the condition of the various air flow for 48h at 30°C. - , 1 vvm; - , 2 vvm; - , 3 vvm; - , 4 vvm.

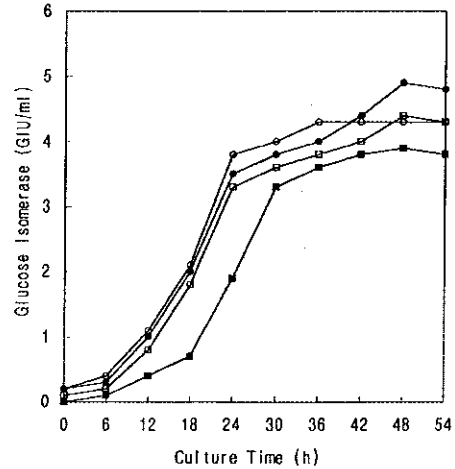


Fig. 3. Profils of glucose isomerase production by the agitation speed variation in jar fermentor culture. *S. chibaensis* J-59 was incubated in the CSL medium under the condition of the various agitation speed for 48h at 30°C. - , 200 rpm; - , 350 rpm; - , 500 rpm; - , 650 rpm.

2. 반응표면 분석을 이용한 효소생산의 최적화

상기 jar fermentor 배양에서 pH는 효소생산에 큰 영향을 주지 않았기 때문에 요인 변수에 포함시키지 않았으나 자동 pH 조절장치로 pH 7.0으로 고정하여 배양하였다. 요인 변수중 glucose 농도는 0.3%에서 0.7%로 0.2% 단위로 3구간 설정하였고, 공기주입량은 1에서 3까지 1vvm 단위로 3구간 설정하고, 교반속도는 400에서 600까지 200rpm 단위로 3구간 설정하여 측정 단위가 다른 변수들과 동등한 비교가 가능하도록 중심합성계획에 따라 표준화된 값을 사용하였다. 따라서 중심합성 실험계획에 의한 포도당 이성화효소의 생산 최적화 요인실험을 행한 결과, 효소생산량의 변화는 표 1과 같이 나타났다. 이를 반응표면분석법에 적용시켜 분석하고 회귀계수를 산출하여 반응표면 2차 회귀모형식을 아래와 같이 구하였다.

$$\text{Glucose isomerase production (GIU/ml)} = -8.443875 + 7.490125 \text{ vvm} + 0.000478 \text{ rpm} + 16.118750 \text{ Glc} + 0.005860 \text{ vvm rpm} - 3.663750 \text{ vvm Glc} - 0.010475 \text{ rpm Glc} - 1.930250 (\text{vvm})^2$$

$$(R^2=0.9776, \text{Pro} > F = 0.046)$$

표 2에서 가정된 반응모형이 자료에 잘 적합되는지를 수량화한 통계량인 결정계수(R-square)는 분석 결과 0.9776으로 나타나 1에 근접하므로, 반응모형이 자료에 잘 적합됨을 알 수 있다. 또 하나의 적합여부를 나타내는 유의 확률(Prob >F)은 0.05보다 작을때 가정된 반응모형이 자료에 잘 적합된다하며 분석 결과에서도 0.046으로 0.05보다 적게 나타났다.

Table 1. Pattern of enzyme production by the treatment combinations(with code numbers indicated and its results)

Number	Number Air flow (v.v.m)	Agitation speed(r.p.m)	Glucose (%)	Glucose isomerase (GIU/ml)
1	1(-1)*	400(-1)	0.3(-1)	2.409
2	1(-1)	400(-1)	0.7(1)	5.158
3	1(-1)	600(1)	0.3(-1)	2.491
4	1(-1)	600(1)	0.7(1)	5.516
5	3(1)	400(-1)	0.3(-1)	3.880
6	3(1)	400(-1)	0.7(1)	4.812
7	3(1)	600(1)	0.3(-1)	7.420
8	3(1)	600(1)	0.7(1)	6.420
9	2(0)	500(0)	0.5(0)	6.735
10	2(0)	500(0)	0.5(0)	6.647

* Code values presented in parentheses

Table 2. Analysis of variance for the glucose isomerase production of *S. chibaensis* J-59

Regression	Degree of freedom	Sum of squares	R-square	R-ratio	Prob >F
Linear	3	13.933633	0.4992	14.878	0.0063
Quadratic	3	5.961384	0.2136	19.096	0.0048
Crossproduct	3	7.393670	0.2649	7.895	0.1145
Total Regress	9	27.288688	0.9776	12.487	0.0461

반응표면의 형태가 올라가는 능선체계 (rising ridge system)로 나타났으므로 능선분석(ridge analysis)하였다. 그림 4는 각 변수들 사이에서 예상되는 포도당 이성화효소의 생산량을 등고선도(contour plot)로 나타낸 그림이다. 그 결과, *S. chibaensis* J-59의 포도당 이성화효소 생산은 세가지 요인변수 중에서 공기 주입량과 포도당 농도에 가장 큰 영향을 받는 것으로 나타났으며, 표 3과 같이 공기주입량은 2.23vvm, 교반속도는 587.5rpm, 포도당의 농도는 0.586% 일 때 효소생산 최대값을 얻게됨을 확인하였다.

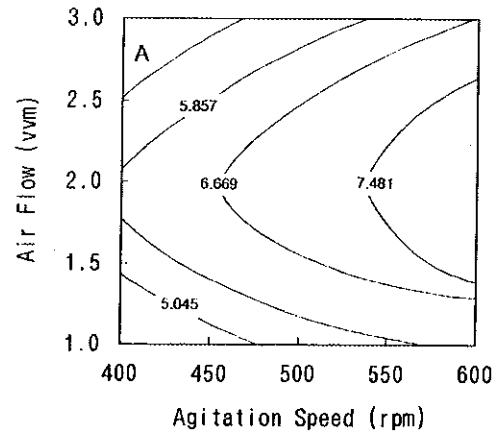


Table 3. The range of optimum conditions of response variables yielding optimum responses by the superimposing of contour maps

Reaction conditions	Range of optimum conditions
Air flow (vvm)	2.226
Agitation speed (rpm)	587.503
Glucose (%)	0.586

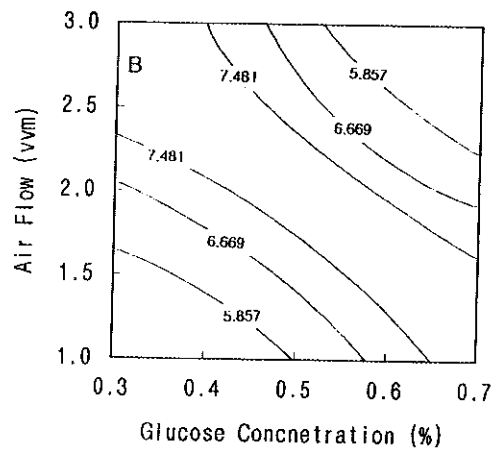


Fig. 4.(A.B)

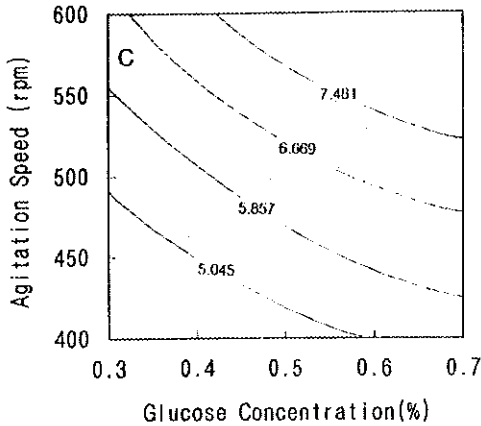


Fig. 4. Contour plots for glucose isomerase activity as related to (A) air flow - agitation speed, (B) air flow - glucose conc., (C) glucose conc. - agitation speed; the other variable was fixed at zero coded level.

반응표면 분석법에 의한 포도당 이성화효소의 최적 생산조건인 1% birchwood xylan, 1.5% CSL, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.012% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (pH 7.0)로 구성된 CSL 배지에서 교반속도 587rpm, 공기주입량 2.2vvm, glucose 농도를 0.586%로 하여 30℃에서 시간별 균의 성장 및 효소 활성을 측정된 결과 42시간 이후 균의 성장 및 효소활성이 일정하게 나타났다. 표 4와 같이 RSM에 의한 최적화조건에서의 효소생산량 예상값은 ml 당 7.67 단위로 나타났고, 동일조건에서 실제 실험한 결과는 효소활성이 7.43 단위로 나타나 예상값과 실제값이 거의 동일하였다. Jar

Table 4. Predicted and experimental values of response variables within the range of optimum conditions

Glucose isomerase (GIU*/ml)	
Predicted values	7.67
Experimental values	7.43

* One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that produced 1 μ mol of D-fructose per min under the assay conditions described.

fermentor 배양에서의 포도당 이성화효소의 생산량은 플라스크 배양때의 효소생산량 (2.78 GIU/ml)보다 약 2.7배 가량 효소생산이 증가되었다.

IV. 적 요

Jar fermentor 배양에서 *S. chibaensis* J-59로 부터 포도당 이성화효소의 최적 생산조건을 확립하기 위하여 반응표면분석을 이용하였다. 실험계획은 중심계획합성법을 이용하였고, 3가지 실험요인으로는 공기주입량(vvm), 교반속도(rpm), 포도당의 농도(%)로 선별하였다. 요인실험의 결과로 회귀계수를 산출한 후 반응표면 회귀식을 구하였다. 효소 생산량의 변화에 대한 회귀식의 결정계수(R²)는 0.9776이었고, 분산분석의 F-ratio가 12.487이었으며, 이때 유의성(Prob)F)은 5% 이내로 인정되었다. 능선분석 결과, 효소생산 최대값은 공기주입량 2.227vvm, 교반속도 587.5rpm, glucose 농도 0.586%로 나타났으며 이때

반응표면 회귀식에 의해 추정하는 예상 효소 활성은 7.67 단위로 나타났다. Jar fermentor 배양에서의 최적화 회귀식에 따라 1% birchwood xylan, 1.5% CSL, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O, 0.012% CoCl₂ · 6H₂O, (pH 7.0)로 구성된 배지에 초기 pH를 7.0으로 조정하여 배양 종료까지 7.0을 유지하면서 공기주입량을 2.2vvm, 교반 속도를 580rpm, glucose 농도를 0.586%로 하여 30℃에서 42 시간 배양하였을때, 실제 효소생산량은 7.43 단위로 상기 분석법에서 예상한 효소 생산량의 97%에 달하였고, 플라스크배양의 효소생산량(2.78 GIU/ml)보다 약 2.7배 가량 효소생산이 증가되었다.

V. 참고 문헌

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
2. Bucke, C. 1981. Industrial glucose isomerase. In *Topic in enzyme and fermentation biotechnology*, Wiseman, A.(ed.), Ellis Horwood, Chichester, UK. p. 1-147.
3. Chen, W. P., Anderson, A. W. and Han, Y. W. 1979. Production of glucose isomerase by *Streptomyces flavogriseus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 324-331.
4. Chen, W. P. 1980. Glucose isomerase. *Process Biochem.*, 15: 30-35.
5. Dische, Z. and E. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination at keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.*, 192: 583-587.
6. Giovanni, M. 1983. Response surface methodology and product optimization. *Food Technol.*, 37: 41-45.
7. Henika, R. G. 1982. Use of response surface methodology in sensory evaluation. *Food technol.*, 36: 96-101.
8. Mand, K., Srikanta, S., Joseph, R., Shanthamma, M. S. and Murthy, V. S. 1977. Production of glucose isomerase by *Streptomyces fradiae*. *J. Experimental Biology*, 15: 668-669.
9. Marshall, R. O. and Kooi, E. R. 1957. Enzymatic conversion of D-glucose to fructose. *Science*, 125: 648-649.
10. Motycka, R. R., Devor, R. E. and Bechtel, P. J. 1984. Response surface methodology approach to the optimization of boneless ham yield. *J. Food Sci.*, 49: 1386-1391.
11. Myers, R. H. 1975. *Response Surface Methodology*. Blacksburg, VA. p65.
12. Schmidell, W., M. V. Fernandes. 1976. The measurement of cellular protein content as a method for determining mold concentration. *J. Ferment. Technol.*, 54: 225-228.
13. Takasaki, Y. 1966. Studies on sugar isomerization enzyme. Production and utilization of glucose isomerase

- from *Streptomyces* spp. Agric. Biol. Chem., 30:
14. 박성현. 1991., 현대실험계획법, 민영사, p. 575.
 15. 주길재, 권기석, 이인구. 1997a., 내열성 포도당 이성화효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. J-59의 분리 및 동정. 한국산업미생물학회지, 25(1): 인쇄중.
 16. 주길재, 이인구. 1997b., 방선균의 *xylB* 변이주에 의한 포도당 이성화효소의 생산. 한국산업미생물학회지, 25(1): 인쇄중.