한국생물공학회지 제 11 권 제 5 호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 11. No. 5. 565-571 (1996)

# *Aspergillus oryzae*에 의한 β-Mannanase 생산배지의 최적화

†오 덕 근 · 김 종 화 · 이 태 규
우석대학교 식품공학과

# Optimization of Medium for β-Mannanase Production by *Aspergillus oryzae*

Deok-Kun Oh†, Jong-Hwa Kim, and Tae-Kyoo Lee
Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Cheonju 565-800, Korea

## ABSTRACT

Medium optimization for β-mannanase production by *Aspergillus oryzae* ATCC 2114 was performed. Effect of carbon source (locust bean gum) concentration on β-mannanase production was investigated. Above 20 g/L locust bean gum, a lag time for β-mannanase production was appeared because high concentration of locust bean gum caused high viscosity which made the mixing of medium poor. As the locust bean gum concentration in the medium increased, β-mannanase activity and cell growth increased proportionally. Effect of various nitrogen sources on β-mannanase production was also studied. $(NH_4)_2SO_4$ and malt extract were the most effective for β-mannanase production among the inorganic nitrogenous compounds and organic nitrogen nutrients. Inorganic compounds such as $KH_2PO_4$, NaCl, $Na_2CO_3$ and $MgSO_4$ on β-mannanase production were optimized for β-mannanase production. Locust bean gum of 10 g/L, malt extract of 3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ of 2 g/L, $KH_2PO_4$ of 10 g/L were selected as the optimal medium. Culture in a fermentor by using the optimal medium was carried out. Lag time of β-mannanase production was shorter due to the better mixing of the fermentor. The maximum β-mannanase activity of 9.7 unit/mL and specific β-mannanase activity of 1.9 unit/mg-cell could be obtained at 27 hours and the productivity of β-mannanase was 0.36 unit/mL·h.

## 서 론

β-Mannan은 mannopyranose의 기본 단위가 β-1,4 결합으로 이루어진 다당류로 mannose의 기본구조외에 glucose 잔기가 포함되어 있는 glucomannan과 galactose와 acetyl기가 포함되어 있는 galactomannan 및 이것에 glucose 잔기가 추가되어 galactoglucomannan으로 존재한다(1). β-Mannan의 효소적 분해는 mannose 기본골격을 공격하여 반응 후 작은 oligomannoside 잔기가 생성되는 β-D-mannanase(β-D-mannan mannohydrolase; EC 3.2.1.78)와 mannose 형태로 완전 분해하는 β-D-mannosidase(β-D-mannonside mannohydrolase; EC 3.2.1.25)에 의하여 수행된다(2).

β-Mannanase는 세균, 곰팡이와 고등식물 등에서 넓게 분포되어 있고 특히, *Bacillus* sp.(2, 3), *Bacillus stearothermophilus*(4), *Bacillus subtilis*(5), *Pseudomonas* sp.(6), *Trichoderma harzianum*(7),

† Corresponding Author

*Trichoderma reesei*(8), *Tyromyces palustris*(9), *Streptomyces* sp.(10), *Caldocellum saccharolyticum* (11)와 *Aeromonas* sp.(12)로부터 생성된다.

팜과 커피의 열매 및 코냑(konjak)의 뿌리 등 여러 식물에 존재하는 mannan(13)은 최근에 다이어트 식품으로 많이 사용되고 있으나 고점도 다당류이므로 가공시 어려움이 존재한다. 그러므로 mannan 가공시 점도조절용으로 β-mannanase를 사용할 수 있다. 또한, mannan을 β-mannanase로 처리시 생성되는 manno-oligosaccharide(MOS)는 인체내 대장의 유용균인 *Bifidobacterium*의 좋은 에너지원일 뿐 아니라 대장내의 유해 미생물의 증식을 저해하는 작용을 한다(14). 그러므로, 향후 MOS를 의약품 원료나 식품 첨가품으로 사용할 가능성이 있다.

지금까지 β-mannanase 생산에 관한 논문은 많으나 *Aspergillus oryzae*에 의한 β-mannanase의 생산 보고는 전혀 없다. 그러므로, 본 연구에서는 *Aspergillus oryzae*를 사용하여 배지성분이 β-mannanase 생산에 미치는 영향을 살펴 보고 β-mannanase의 생산성을 증가시키기 위하여 각 배지성분의 최적 농도를 구하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 미생물 및 배지

본 연구에서 사용한 미생물은 *Aspergillus oryzae* ATCC 2114이었다. 발아배지로는 glucose 10 g/L, peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L로 구성된 배지를 사용하였고 β-mannanase 생산배지로는 탄소원으로 locust bean gum 10 g/L (또는 5~30 g/L) 질소원으로 malt extract와 $(NH_4)_2SO_4$, 또한 무기염으로 $KH_2PO_4$로 구성된 배지를 사용하였고 각 성분의 양은 β-mannanase의 생산성을 높이기 위하여 변화시켰다.

### 배양조건

발아배양은 agar plate(발아배지+15 g/L agar)의 포자를 1.0%의 Tween 20 용액으로 용출시켜 pH가 5.0으로 조절된 발아배지 50 mL가 들어있는 250 mL 플라스크에 1 mL을 접종한 후 진탕 배양기에서 240 rpm, 30℃로 약 24시간 동안 수행하였다. 플라스크 배양에서는 발아배양액 2 mL를 β-mannanase 생산배지가 50 mL 들어있는 250 mL 플라스크에 접종하여 배양온도는 30℃, 초기 pH는 5.0, 교반속도는 240 rpm으로 하여 36시간 배양하였다. 이때, 배양중 pH는 조절하지 않았다. 발효조 배양은 발아배양액을 배지부피가 3L인 5L 발효조(한국발효기(주))에 접종량을 5%로 하여 접종하였다. 배양온도는 30℃로 하였고 배양중의 pH는 발효 전 과정 동안 5N NaOH를 사용하여 5.0으로 일정하게 조절하였고, 용존산소 농도는 20% 이상 유지시키기 위하여 통기량을 1.0 vvm으로 하고 교반속도를 600 rpm에서 1000 rpm의 범위로 조절하여 β-mannanase의 역가가 감소할 때까지 배양하였다.

### 분석방법

균체 농도와 β-mannanase의 역가를 측정하기 위하여 배양액을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리(Hitachi, Japan)한 상등액을 β-mannanase의 역가 측정에 사용하였고 침전균체는 증류수로 3,000 rpm에서 20분간 2회 세척하고 105℃에서 24시간 동안 건조시킨 후 건조 균체량을 측정하였다. β-mannanase의 역가는 0.5 mL의 10 g/L locust bean gum, 0.4 mL의 0.05M citrate buffer(pH 5.0)와 0.1 mL의 균체가 제거된 배양액을 섞어 50℃에서 5분간 반응시킨 후 생성된 mannose를 환원당 측정법인 DNS법으로 측정하였다(15). 1 unit의 β-mannanase는 상기의 조건에서 분당 생성되는 D-mannose에 해당하는 1mmol의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

## 결과 및 고찰

### β-Mannanase의 생산을 위한 여러 가지 배지의 검토

β-mannanase의 역가가 가장 높게 생성되는 배지를 선정하기 위하여 기존에 β-mannanase의 생산에 사용된 배지를 중심으로 여러 가지 배지를 검토하였다(Table 1). 배지 1은 *Bacillus* sp.(3)에 의한 β-mannanase 생산배지를 근거로 하였고, 배지 2는 *Trichoderma reesei*(8)에 의한 β-mannanase 생산배지를 근거로 하였고, 배지 3은 *Caldocellum saccharolyticum*(11) β-mannanase 생산배지를 근거로 하였고, 배지 4는 배지 3의 질소원을 yeast extract 중심으로 재구성한 것이다.

여러 가지 배지에서 β-mannanase의 생산을 시도한 결과 Fig. 1과 같았다. β-mannanase의 역가는 배지 1에서 3.96 unit/mL로 가장 높았고 최대 역가가 54시간에서 나타났다. 이에 비하여 배지 2에서는 β-mannanase의 역가가 3.36 unit/mL로 배지 1보

Table 1. Proposed media for the $\beta$-mannanase production of *Aspergillus oryzae*.

| Component(g/L) | Medium 1 | Medium 2 | Medium 3 | Medium 4 |
|---|---|---|---|---|
| Locust bean gum | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Peptone | 10 | 5 | 10 | – |
| Yeast extract | – | – | 2 | 5 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | – | 2 | – | 2 |
| $NH_4Cl$ | – | – | 3 | – |
| $K_2HOP_4$ | 2 | – | – | – |
| $KH_2PO_4$ | – | 10 | 1 | 5 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2 | – | 0.2 | 0.2 |

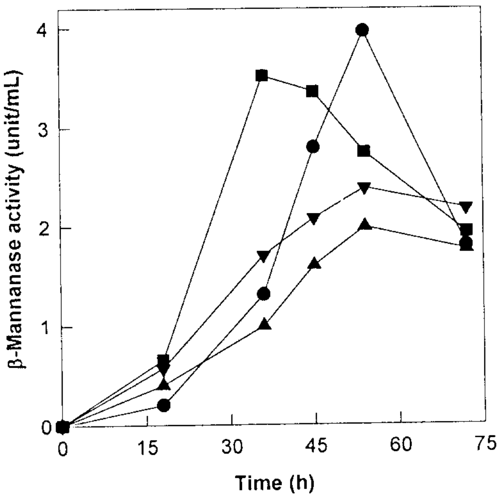


Fig. 1. $\beta$-Mannanase production of *Aspergillus oryzae* by using the proposed media. medium 1 (●), medium 2 (■), medium 3 (▲), and medium 4 (▼).

다 낮지만 최대역가가 36시간에서 나타나 생산성은 0.09 unit/mL·h로 배지 1의 0.07 unit/mL·h 보다 높아 배지 2를 $\beta$-mannanase의 생산 최적화를 위한 기본배지로 선정하였다.

탄소원의 농도가 $\beta$-mannanase의 생산에 미치는 영향

선정된 배지 2에서 탄소원인 locust bean gum의 농도를 달리하여 발효를 수행하였다(Fig. 2). Locust bean gum의 농도가 20 g/L 이상일 때는 초기의 점도가 높아 혼합이 거의 되지 않아 초기에 $\beta$-mannanase의 생산이 지연되는 것으로 나타났다. 그 결과 $\beta$-mannanase의 생산성은 locust bean gum의

Table 2. Effect of the concentration of locust bean gum on the parameters of $\beta$-mannanase fermentation.

| Locust bean gum(g/L) | $P_m$ (unit/mL) | $X$ (g/L) | $Y_{P/X}$ (g/g) | $Y_{P/S}$ (g/g) | $P$ (unit/mL·h) |
|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 1.53 | 2.18 | 0.70 | 0.31 | 0.05 |
| 10 | 3.61 | 5.56 | 0.65 | 0.36 | 0.10 |
| 15 | 6.20 | 9.12 | 0.68 | 0.42 | 0.13 |
| 20 | 8.02 | 12.21 | 0.66 | 0.40 | 0.17 |
| 30 | 10.76 | 15.21 | 0.70 | 0.36 | 0.20 |

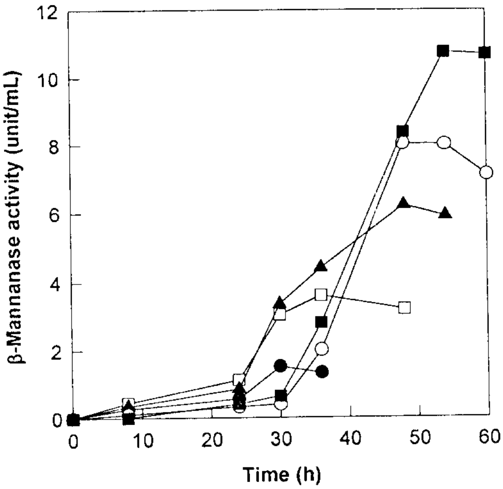


Fig. 2. Effect of the concentration of locust bean gum on the $\beta$-mannanase production of *Aspergillus oryzae*. The concentrations of locust bean gum were 5 g/L (●), 10 g/L (□), 15 g/L (▲), 20 g/L (○), and 30 g/L (■).

농도가 증가할수록 증가하였으며 또한 $\beta$-mannanase의 역가와 균체농도가 비례적으로 증가하였다 (Table 2). 그러나, 본 균주와 달리 *Bacillus* sp.의 경우 locust bean gum의 농도가 10 g/L 이상에서는 오히려 역가가 감소하였다(3). 단위 균체가 생성하는 $\beta$-mannanase의 수율은 locust bean gum의 농도에 상관없이 거의 일정하였으나 단위 기질당 생성된 $\beta$-mannanase의 수율은 차이가 나타나 15 g/L의 locust bean gum의 농도에서 최대값을 보여주었다. 이러한 차이는 질소원의 농도가 일정한 상태에서 탄소원의 농도만 증가하여 C/N(탄소원/질소원) 비율의 변화로 초래된 결과가 아닌가 생각된다.

Table 3. Effect of various nitrogen sources on β-mannanase production.

| Nitrogen sources(5 g/L) | Dry cell weight(g/L) | β-Mannanase activity(unit/mL) | Specific β-mannanase activity(unit/mg-cell) |
|---|---|---|---|
| Inorganic Nitrogen | | | |
| $NH_4Cl$ | 3.50 | 2.90 | 0.83 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 3.43 | 2.97 | 0.87 |
| $NH_4NO_3$ | 1.64 | 1.93 | 1.18 |
| $NH_4H_2PO_4$ | 3.72 | 2.52 | 0.68 |
| $NH_4HCO_3$ | 2.28 | 1.80 | 0.79 |
| Organic Nitrogen | | | |
| Corn steep liquor | 2.11 | 1.42 | 0.67 |
| Malt extract | 5.28 | 4.40 | 0.83 |
| Peptone | 5.20 | 3.00 | 0.58 |
| Soybean flour | 7.04 | 3.47 | 0.49 |
| Trypton | 2.21 | 2.08 | 0.94 |
| Yeast extract | 6.33 | 2.50 | 0.39 |
| Yeast nitrogen base | 2.86 | 2.16 | 0.76 |

### 질소원이 β-mannanase의 생산에 미치는 영향

Locust bean gum 50 g/L, 질소원 5 g/L, $KH_2PO_4$ 10 g/L으로 구성된 발효배지에서 여러 가지 질소원을 달리하여 36시간 동안 배양한 후 질소원이 β-mannanase의 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다 (Table 3). 비 β-mannanase 역가(단위 균체농도당 β-mannanase의 역가)는 무기질소원 중에는 $NH_4NO_3$가 가장 높았고 유기질소원 중에는 trypton이 가장 높았으나 이들 질소원에서는 균체농도가 낮아 β-mannanase 역가는 낮게 나타났다. 균체농도는 무기질소원 중에서는 $NH_4H_2PO_4$이 가장 높았고 유기질소원 중에서는 soybean flour가 가장 높았다. β-mannanase의 역가는 무기질소원 중에서는 $(NH_4)_2SO_4$가 가장 높았고 유기질소원 중에서는 malt extract가 가장 높았다. 세균인 *Bacillus* sp.의 경우는 무기질소원의 배지에서 β-mannanase의 역가가 현저히 감소함을 보여주었지만(2) 곰팡이인 본 균주의 경우는 무기질소원의 배지에서 비교적 높은 역가를 보여 주었다.

β-Mannanase의 역가가 가장 좋게 나타난 질소원인 malt extract를 선택하여 malt extract의 농도가 β-mannanase의 역가에 미치는 영향을 플라스크에서 수행하였다(Fig. 3). Malt extract의 농도가 증가할수록 균체의 농도는 증가하여 malt extract 10 g/L에서는 균체농도가 약 6 g/L까지 보여주었다. β-Mannanase의 역가는 malt extract를 첨가하지 않을 경우에는 매우 낮았으며 3 g/L 첨가할 경우 최대값을 나타내었고 그 이상에서는 오히려 감소하여 malt extract의 최적농도를 3 g/L으로 결정하였다. 또한, malt extract의 농도 변화에 대한 비 β-mannanase의 역가는 β-mannanase의 역가와 비슷한 양상을 보여주었다.

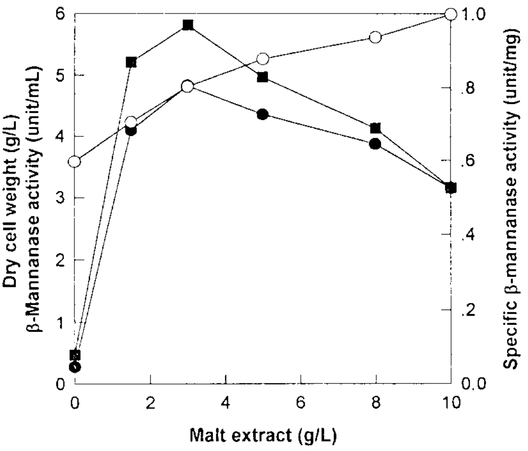


Fig. 3. Effect of malt extract on β-mannanase activity and cell growth of *Aspergillus oryzae*. Dry cell weight (○), β-mannanase activity (●), and specific β-mannanase activity (■).

질소원으로 malt extract 3 g/L에 무기질소원인 $(NH_4)_2SO_4$을 첨가하여 첨가한 $(NH_4)_2SO_4$이 균체증

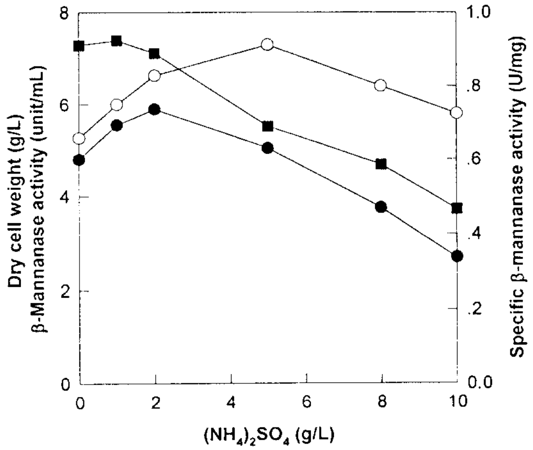


Fig. 4. Effect of ammonium sulfate on β-mannanase activity and cell growth of *Aspergillus oryzae*. Dry cell weight (○), β-mannanase activity (●), and specific β-mannanase activity (■).

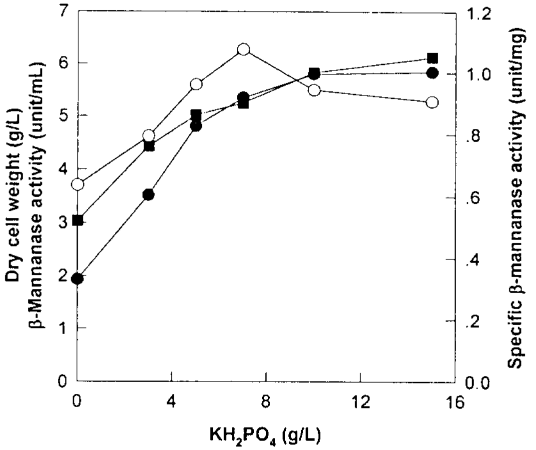


Fig. 5. Effect of potassium diphosphate on β-mannanase activity and cell growth of *Aspergillus oryzae*. Dry cell weight (○), β-mannanase activity (●), and specific β-mannanase activity (■).

식과 β-mannanase의 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다(Fig. 4). 균체의 농도는 5 g/L의 $(NH_4)_2SO_4$에서 최대값을 보였고 β-mannanase의 역가는 2 g/L에서 최대값을 보였으며 비 β-mannanase의 역가는 2 g/L 이내에서는 비교적 일정하였지만 그 이상의 농도에서는 급격히 감소하였다. 그러므로 $(NH_4)_2SO_4$의 최적농도는 β-mannanase의 생산량을 기준으로 선정하여 최적농도를 2 g/L으로 결정하였다. 유기질소원인 malt extract만 또는 무기질소원인 $(NH_4)_2SO_4$만 첨가하는 것보다 malt extract와 $(NH_4)_2SO_4$를 함께 첨가할 경우 β-mannanase의 역가가 더 높게 나타났다.

### 무기염이 β-mannanase의 생산에 미치는 영향

Locust bean gum 10 g/L, malt extract 3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L 및 인산염으로 구성된 발효배지를 사용하여 인산염의 농도가 β-mannanase 역가에 미치는 영향을 살펴 보았다. Fig. 5에서 나타난 것처럼, 균체농도는 $KH_2PO_4$의 농도가 7 g/L에서 최대값을 보였다. β-Mannanase의 역가는 $KH_2PO_4$의 농도가 10 g/L까지는 급격히 증가하였고 그 이상에서는 큰 차이를 보여주지 않았지만 비 β-mannanase의 역가는 $KH_2PO_4$의 농도가 증가할수록 증가하였다. 그러나 최적 $KH_2PO_4$의 농도는 β-mannanase의 생산성을 기준으로 하여 10 g/L으로 결정하였다.

다른 논문들(2-7)에서 β-mannanase의 역가 향상에 기여한 무기염들인 NaCl, $MgSO_4$ 및 $Na_2CO_3$의 β-mannanase의 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 무기염들은 *A. oryzae*의 β-mannanase의 역가를 향상시키지 못하였다.

최적배지로 locust bean gum 10 g/L, malt extract 3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, $KH_2PO_4$ 10 g/L로 선정하였으며 최적배지에서 플라스크 배양 β-mannanase의 역가는 거의 6 unit/mL에 접근하였다.

### 발효조에서의 β-mannanase의 생산

최적배지를 사용하여 발효조에서 locust bean gum의 농도를 10 g/L으로 하여 β-mannanase의 생산을 시도하였다(Fig. 6). 플라스크 배양에서는 *A. oryzae* 균체가 pellet 형태로 증식하였지만 발효조에서는 교반기의 높은 전단력으로 인하여 균사체 형태로 증식하였다. 배양초기 플라스크 배양에서의 고점도 기질(locust bean gum)에 의한 불충분한 혼합을 발효조 배양에서는 교반속도를 증가시켜 해결할 수 있었다. 그 결과 배양초기에 나타나는 β-mannanase 생산 지연현상을 감소시킬 수 있었고 배양시간도 단축할 수 있었다. 27시간 배양한 후 β-mannanase의 역가, 비 β-mannanase의 역가와 균체농도를 각각 9.7 unit/mL, 1.90 unit/mg-cell와 5.1

Table 4. β-Mannanase production by *Bacillus* sp. YA-14, *Trichoderma harzianum*, and *Aspergillus oryzae*.

| Microorganisms | $P_m$(unit/mL) | P(unit/mL·h) | Time(h) | Reference |
|---|---|---|---|---|
| *Bacillus* sp. YA-14 | 7.0 | 0.44 | 16 | (3) |
| *Trichoderma harzianum* | 0.7 | 0.004 | 192 | (7) |
| *Aspergillus oryzae* | 9.7 | 0.36 | 27 | In this study |

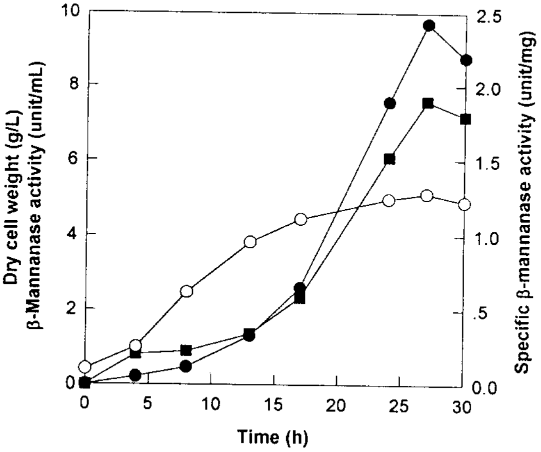


Fig. 6. Culture for β-mannanase production in a fermentor by using the optimal medium. Dry cell weight (○), β-mannanase activity (●), and specific β-mannanase activity (■).

g/L으로 얻었다. 이때, 생산성은 0.36 unit/mL·h이었다. β-Mannanase의 생산성이 높게 나온 다른 경우를 살펴 보면(Table 4), 세균인 *Bacillus* sp.(3)는 발효시간 16시간에 최대 β-mannanase의 역가 7 unit/mL를 나타내어 생산성으로 환산하면 0.44 unit/mL·h이었다. 곰팡이인 *Trichoderma harzianum*(7)의 경우는 8일간 배양하여 β-mannanase의 역가 0.7 unit/mL를 보여주어 생산성 0.004 unit/mL·h이었다. *A. oryzae*에 의한 β-mannanase의 생산성을 세균인 *Bacillus* sp.의 생산성과 비교하면 *Bacillus* sp.보다 낮게 나타난다. 그러나, 최종 β-mannanase의 역가가 *Bacillus* sp.보다 더 높고 *Bacillus* sp.의 경우는 탄소원(locust bean gum)의 농도가 증가할수록(10 g/L 이상) 오히려 감소함(3)에 비하여 *A. oryzae*의 경우 탄소원의 농도가 증가할수록 증가하는 장점이 존재하여 산업적 적용 가능성이 높다고 할 수 있다.

## 요 약

*Aspergillus oryzae* ATCC 2114를 사용하여 β-mannanase의 생산에 영향을 주는 배지성분의 최적화를 수행하였다. 탄소원인 locust bean gum의 농도를 달리하여 발효를 수행하였다. Locust bean gum의 농도가 20 g/L 이상일 때는 초기의 점도가 높아 혼합이 거의 되지 않아 초기에 β-mannanase의 생산이 지연되는 현상이 나타났고, Locust bean gum의 농도가 증가할수록 β-mannanase의 역가와 균체농도가 비례적으로 증가하였다. Locust bean gum 10 g/L 배지에서 여러 가지 질소원이 β-mannanase의 생산에 미치는 영향을 살펴 본 결과 β-mannanase의 역가는 무기질소원 중에서는 $(NH_4)_2SO_4$가 좋았으며 유기질소원 중에서는 malt extract가 가장 좋았다. 여러 가지 무기염의 최적화를 수행한 결과 $KH_2PO_4$가 β-mannanase의 생산에 중요한 인자임을 알 수 있었다. 배지최적화 결과 최적배지로 locust bean gum 10 g/L, malt extract 3 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, $KH_2PO_4$ 10 g/L이 결정되었으며 이때 β-mannanase의 역가는 거의 6 unit/mL에 접근하였다. 최적배지를 사용하여 발효조에서 배양을 수행하였다. 발효조의 혼합효과로 배양초기에 나타나는 β-mannanase 생산 지연현상을 감소시킬 수 있었고 배양시간도 단축할 수 있었다. 27시간 배양한 후 β-mannanase의 역가 9.7 unit/mL와 비 β-mannanase의 역가 1.9 unit/mg-cell을 얻었다. 이때, 생산성은 0.36 unit/mL·h이었다.

## 용어 설명

| | |
|---|---|
| $P_m$ | maximum product activity(unit/mL) |
| $S$ | substrate(locust bean gum) concentration (g/L) |
| $X$ | dry cell weight(g/L) |
| $Y_{P/X}$ | overall product yield from cell growth(g/g) |
| $Y_{P/S}$ | overall product yield from substrate consumption(g/g) |

$P$ volumetric productivity of $\beta$-mannanase (unit/mL·h)

subscript

$m$ maximum value

$P/X$ product concentration/cell concentration

$P/S$ product concentration/substrate concentration

## 참고문헌


1. R. F. H. Dekker(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1127.
2. T. Akino, N. Nakamura, and K. Horikoshi (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 323.
3. D. S. Min, Y. J. Chung, D. H. Bai, and J. H. Yu(1995), *Foods Biotechnol.*, **4**, 285.
4. G. Talbot and J. Sygusch(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3505.
5. K. E. Eriksson and M. Winell(1968), *Acta Chem. Scand.*, **22**, 1924.
6. I. Yamaura, T. Matsumoto, M. Funatsu, and Y. Funatsu(1990), *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2425.
7. J. P. Torrie, D. J. Senior, and J. N. Saddler (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 303.
8. I. Arisan-Atac, R. Hodits, D. Kristufek, and C. P. Kubicek(1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 58.
9. M. Ishihara and K. Shimizu(1980), *Mokuzai Gakkaishi*, **26**, 811.
10. R. Takahashi, I. Kusakabe, H. Kobayashi, K. Murakami, A. Maekawa, and T. Suzuki (1984), *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2189.
11. P. A. Bicho, T. A. Clark, K. Mackie, H. W. Morgan, and R. M. Daniel(1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 337.
12. T. Araki and M. Kitamikado(1981), *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **47**, 753.
13. T. Akino, W. Nakamura, and K. Horikoshi (1988), *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 773.
14. K. Tohyama, Y. Kobayashi, T. Kan, K. Yazawa, T. Terashima, and M. Futai(1981), *Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 323.
15. G. L. Miller(1967), *Anal. Chem.*, **31**, 426.