

## 단백질 분해효소 생산 균주 분리

### Isolation of Protease Producing Microorganisms

김기은

Gi Eun Kim

서경대학교 화학생명공학과

Department of Biotechnology, Seokyeong University

(2014년 1월 21일 접수, 2014년 4월 3일 채택)

**Abstract :** Protease producing microorganisms were isolated from many kinds of food waste and fermented foods, which contains high amount and variable kinds of degraded substances. Several microorganisms were identified by 16S rRNA full sequencing analysis methods. The activity of protease was analyzed and identified in variable conditions for the application. For industrial use for biowaste treatment some proteases were isolated, identified and selected from microbial cells. And the tests were carried for the further use. The protein degrading activity at low temperature is useful for the treatment of organic waste, which contains much proteins. By the protein degradation process the organic waste can be utilized in variable fields, for example from feedstuff supplement to fertilizer for agriculture. Bacterial cells with protease activity at low temperature were isolated and identified. The optimal conditions for microbial cultivation and protease production were studied.

**Key Words :** Protease, Isolation, Identification, Enzyme Activity, Degradation of Organic Waste, Fertilizer

**요약 :** 영양 성분을 함유하고 있는 유기성 폐기물은 미생물에 의해 처리되어, 유용한 물질로 전환될 수 있다. 이러한 생물학적 공정에서 미생물 세포와 효소는 원료 물질인 기질과 함께 중요하다. 대규모화 공정에서도 미생물 세포와 효소는 공정 최적화에서 필수적인 요소이다. 본 연구에서는 이러한 생물학적 공정의 효율성을 높이는 목적으로 다량의 아미노산과 단백질을 함유하고 있는 많은 종류의 부패가 진전된 유기성 폐기물과 발효 식품에서 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 분리하였다. 단백질 분해 효소의 활성, 온도와 산도 등 활성 조건과 활성 정도를 확인하여 선택된 균주들을 동정하였다. 산업적으로 저온에서 단백질을 분해하는 효소는 유기성 폐기물을 저온에서 처리할 수 있다. 저온에서 처리가 가능하다는 것은 폐기물의 처리 온도를 낮은 상태로 유지할 수 있어 그 만큼의 열(steam)비용을 줄일 수 있다. 또한 이 단백질 분해효소를 이용하여 단백질을 분해 후 다량의 아미노산을 생산할 수 있으므로 아미노산 생산 공정에도 적용이 가능하다. 이렇게 유기 폐기물을 처리하여 다양한 용도로 사용할 수 있으므로, 폐기물의 가치를 높일 수 있다. 다양한 활성 조건에서 단백질 분해효소를 다량으로 생산하는 균주를 분리하여 동정하고, 균주 배양 조건, 효소 생산의 최적 조건에 대한 연구를 수행하였다.

**주제어 :** 단백질 분해효소, 미생물 분리, 동정, 효소 활성, 유기성 폐기물 분해, 비료

## 1. 서론

단백질가수분해효소는 단백질을 펩티드단위로 가수분해하며 산업, 의약, 식품, 피혁분야 등 다양한 분야에서 사용된다. 단백질가수분해효소는 산업분야에서 중요한 효소중의 하나이기에 시장규모가 매우 크다. 대략 전체 효소 시장의 60% 정도 되는 것으로 평가되고 있다.

단백질 분해효소는 전통적으로 식품의 가공과정에서, 육질연화와 발효음료 제조과정에서는 혼탁을 방지하고, 제약공업 분야에서는 소화제, 소염 진통제로서, 또한 피혁공업이나 세제산업분야 등 여러 분야에서 광범위하게 사용되고 있다.<sup>1,2)</sup>

우선 어류, 육류 폐기물 등 여러 가지 부패된 유기성 폐기물과 김치, 젓갈, 된장 등 발효 식품에서 단백질 분해력을 보유할 것으로 사료되는 미생물 십여 종을 분리하였다. 이 중에서 여러 온도 조건에서 단백질분해력이 우수하고, 효소도 빠르게 생산하고, 유해성이 없는, 된장에서 분리된 미생물들을 선별하였다.

된장은 세계적으로 알려진 대표적인 콩발효 식품이며, 한국의 식생활에서 필수적인 식품으로, 콩을 익히고, 여러 가지 형태로 메주를 만들어서 건조시킨 후 서서히 발효시킨다. 전통적으로 가을에 수확된 콩을 끓는 물에 익힌 후, 일반적으로 벽돌모양을 만들어 말린 후, 딱딱해지면, 벗짚을 꼬아 공기 중에 매달 수 있게 만든다. 발효과정은 동절기 중 천정에 고정시켜 놓으면, 이른 봄까지 서서히 공기 중에서 곰팡이들에 의해 발효된다. 된장의 독특한 맛과 향은 발효과정에 작용하는 미생물과 발효결과 생긴 부산물에 의해 생성된다. 발효에 참여하는 미생물 중에는 여러 가지 곰팡이가 있으며, 소금이 첨가된 후 장독 내에서는 서서히 단백질이 분해되면서, 다양한 맛과 향, 독특한 냄새성분이 생성된다.

단백질분해효소는 모든 생물체에서 생성되며, 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물 세포에 의해 다량 생산된다. 특히 미생물세포에 의해 생산되는 단백질분해효소는 세포의 대량배양을 통해 안정적으로 생산할 수 있으며, 공정을 최적화하여 생산성과 경제성을 높일 수 있으므로 산업적 측면에서 매우 유용하므로, 용도와 기능에 따라 지속적으로 개발되고 최적

† Corresponding author E-mail: gkeun@skuniv.ac.kr Tel: 02-940-7127 Fax: 02-919-0345

화되고 있다. 특히 세균은 단백질분해효소를 세포 밖으로 분비하고, 이는 공정상 여러 가지 장점을 가지고 있으므로 산업화를 목적으로 지속적으로 연구 개발되고 있다.

미생물에 있어서 세포의 단백질가수분해효소의 역할은 사람이나 동물이 소화기관인 장내로 분비되는 효소의 경우와 유사하다. 따라서 세포외부에 존재하는 고분자성의 단백질을 세포내로 흡수하기 전에 미리 흡수 가능한 단위인 저분자성 아미노산 단위로 분해하기 위하여 단백질가수분해효소를 분비하고, 특히 고분자 단백질의 흡수 기작이 없는 미생물에게 단백질가수분해효소의 분비는 세포외 효소로서 탄수화물분해효소나 지방분해효소 등과는 그 역할이 차별화된다. 이는 열량원외에 질소원으로 영양물질을 흡수할 수 있으므로, 미생물 세포에게는 매우 중요한 의미가 있다.<sup>3)</sup>

본 연구에서는 어류와 육류 폐기물 등 여러 가지 부패된 유기성 폐기물과 김치, 젓갈, 된장 등 발효 식품에서 단백질분해력을 보유한 미생물들 중 여러 온도 조건에서 단백질분해력이 우수하였다. 또한, 효소도 빠르게 생산하고, 유해성이 없는, 된장에서 분리된 미생물들을 선택하였고, 의미있을 수 있다고 추정되는 균주들을 선택하여 동정하고 연구하였다. 다른 식품폐기물에 *Bacillus subtilis*를 이용하여 발효를 실시하고, 그 발효산물의 특성을 파악하여 감귤 가공부산물을 기능성 소재로서의 활용가능성이 모색된 바 있다.<sup>4)</sup> 농업분야에서도 아미노산은 중요한 영양소이며, 여러 가지 방법으로 생산이 가능하나 경제성 있는 생산 공정이 필요하다. 따라서 폐기되는 단백질 자원으로부터 아미노산을 생산하기 위한 방법으로 쉽게 생산이 가능하고, 특히 저온에서 활성도가 높은 단백질 분해효소를 찾는 연구는 산업에서 중요하다.

미생물 세포에 의해 생산되는 효소는, 화학적으로 구조가 다양하며, 폴리머 분해에 다양한 적용이 가능하다. 이러한 효소에 의한 혈액처리는 화학적 처리법과 비교하여 이차 환경오염의 가능성이 낮고, 아미노산농도도 더 높으므로, 액비의 경제성도 높아진다. 액비는 유리아미노산과 펩타이드를 다량 함유하고 있으므로 식물영양에 매우 유용하다. 기존 연구에 의하면 적당량 액비를 사용하게 되면, 식물의 생장에 효과가 있다고 한다.<sup>5)</sup> 또한 식물의 각 부위에 있는 질소는 대부분 단백질 분자 내에 있는 것이기 때문에 생장시기에 따른 질소 함량의 변화는 단백질의 분해와 합성의 정도를 반영하는 것이고, 앞에서는 단백질의 절반이 엽록체에 존재한다. 식물의 각 부위에 있는 질소는 대부분 단백질 분자 내에 있는 것이기 때문에 생장시기에 따른 질소 함량의 변화는 단백질의 분해와 합성의 정도를 반영하는 것이고, 앞에서는 단백질의 절반이 엽록체에 존재한다. 따라서 식물은 아미노산을 식물체 내에서 자체적으로 합성하거나 외부로부터 흡수하여 단백질 형태로 저장 또는 대사에너지로 전환, 생리활성 등 다양한 용도로 사용하고 있다. 아미노산의 식물에 대한 작용 기작에 대해서는 많은 부분이 아직 밝혀지지 않았지만, 각 아미노산 별로 그 기능이 점차 밝혀지고 있다. 이러한 식물에 대한 직접적인 아미노산의 작용 외에도 토양미생물의 영양원으로 작용하여 미생물의 증식을 활발하게 하여 식물의 뿌리활력과 토양 부식의 기본이 된다. 토양부식은 보수력을 향상시키고, 각종 영양원을 고정화하여 토양의 생산력을 증대시키는 효과가 있다.

본 논문에서는 여러 가지 발효 제품에서 단백질 분해효소를 생산하는 균주를 선별하였다. 산업적 이용가능성을 바탕

Table 1. Essential amino acids as plant nutrients<sup>5)</sup>

Amino acids	Functions in plant growth stimulation in root and leasoilt
Lysine (Lys)	Uprooting and catalyst for leaf
Aspartic acid (Asn)	Single grain of soil effects, the increase in acidity, sweetness enhancement
Valine (Val)	Increase of fruit flavor, the growth inhibitory effects of pathogens
Leucine (Leu)	Gloss Increase of fruit flavor, the growth inhibitory effects of pathogens
Glutamine (Gln)	Plant configuration, and promote the growth of roots and leaves, sugar content increase, combined with potassium salts improvement in bacterial
Alanine (Ala)	Sweetness, acidity increases, color enhancement
Histidine (His)	Acidity, flavor enhancement
Phenylalanine (Phe)	Inhibit pathogens, antimicrobial substances
Glycine (Gly)	Promoting sugar, flavor enhancement, increased cold
Serine (Ser)	Sugar accumulation, growth hormone promotes growth
Arginine (Arg)	Flavor enhancement, pathogen suppression, sweetness enhancement, growth-promoting
Threonine (Thr)	Enhancement of sweetness and acidity, Fruit Setting and fruit growing
Proline (Pro)	nti-stress, promotes differentiation of flower buds, modify, promote, flesh hypertrophy, a major component of pollen Fruit Setting Promotion, promotion of sugar, salt eliminate interference
Tyrosine (Tyr)	Enhanced disease resistance, strengthen the immune system
Methionyl (Met)	Sulfated amino acids, enhance the growth of plant cells, female flowers attract aging, promoting the accumulation of mature sugar hormone, the control action chiren synthesis, auxin (IAA), a physical wound healing, improve chilling injury, improve drought stress, the growth inhibitory effects of pathogens
Cystine (Cys)	Sulfated amino acids, protein synthesis, and growth-promoting bioactive
Isoleucine (Ils)	Promote fruit coloring

으로 진행된 기초 실험으로 저온에서 활성화를 나타내는 균주를 찾고 이 균주에 대한 특성을 확인하였다.

## 2. 실험 및 방법

### 2.1. 균주 분리

단백질 분해 효소를 생산하는 균주들은 서울 지역의 일반 가정에서 발생된 단백질 함유 식품 폐기물을 수거하고, 동시에 3년 이상 발효가 진행된 다양한 종류의 된장과 간장 시료를 각각 3종씩 수집하고, 선택하여 균주들을 분리하였다. 시료들을 각각 멸균된 생리식염수로 희석하고 세균, 유산균, 효모와 곰팡이 종류를 분리하는 배지를 준비하고 희석단계 를 거쳐 아가 배지에 각각 접종하였다.<sup>6-8)</sup> 생성된 콜로니를 확인하고 각 시료 당 총균 수를 측정 한 후 콜로니를 채취하여 액체배지에서 계속 배양하였다. 효소생성을 보여주는 균주들을 선택하고, 액체배지에 접종하여 shaking incubator에서 120 rpm으로 48시간 배양시킨 후 4℃에서 보관하며 종균으로 사용하였다. 종균들은 냉동보관을 위해 glycerol로 처리하여 -80℃에서 3개월마다 계대배양하였다. 분리된 균주들중 활성이 가장 좋은 균주들을 선택하여, 배양 후 (주) 마크로젠에 의뢰하여 16S rRNA full sequencing방법으로 균을 동정하였고, rRNA database (national center for biotechnology information, NCBI; ribosomal database project, RDP; European ribosomal RNA database, ERRD)와 비교하여 대상 미생물의 종류를 확인하였다.

### 2.2. 단백질 분해효소의 온도별 활성도 확인

콜로니를 액체 배지에서 배양한 후, 배양액을 원심분리기 (Micro-12, Hanil)에서 분리하고, 상등액을 paper disc (Kor-161, Advantec Ltd.)를 넣고 흡수하도록 하였다. 보통 15분 정도면 충분한 양이 흡수 및 흡착된다고 판단되어 약 15분간 정치시켰다. 다음 멸균된 배지에 멸균된 skim milk액을 추가하여 아가배지에서 고형배지화한다. 이렇게 제조된 skim plate 표면에 상등액이 흡착된 paper disc를 올려 놓고, 24시간에서 48시간 정도 여러 온도상에서 배양하고, clear zone의 생성 여부를 통해 단백질 분해 정도, 단백질 분해효소의 작용을 확인하였다. 이 실험은 기존의 방법<sup>9)</sup>에 따라 실시하였다.

### 2.3. 생장곡선 측정

시료에서 분리된 균주 중 저온에서 활성도가 높은 단백질 분해효소가 생성하는 균주들을 선택하였고, 선택한 균주는 35℃, shaking incubator에서 120 rpm으로 배양하면서, 2시간마다 시료를 채취하였다. spectrophotometer (UV1700 phar-maspec, Shimadzu)를 이용하여 660 nm에서 O.D값을 측정 하고, glucose 분석키트(Bcs glucose kit-MF 0801, Bioclinical System Ltd.)를 이용하여 tube에 효소액 3 mL와 측정할 검체와 맹검(맹검은 3차수를 이용하여 대조군으로 하였다)을 20 μL을 넣고 37.9℃에서 중탕한 후 spectrophotometer를 사

용하여 505 nm에서 glucose농도를 측정하였다.<sup>10,11)</sup> glucose 농도계산은 아래의 식을 이용하였다.

$$\text{Glucose량(mg/dl)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준의 흡광도}} \times 200 \text{ (ml/dl)} \quad (1)$$

### 2.4. 효소 생산 실험

미생물 배양과정에서 효소 생산과정을 추적하기 위한 목적으로 접종 후 2시간마다 시료를 채취하여 실험 및 방법 2.2에 제시한 방법으로 단백질분해효소의 활성을 확인하는 실험을 실시하고, 활성도의 크기를 측정하였다. 이 방법은 기존의 방법<sup>9)</sup>을 변형하여 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 단백질분해효소 균주 확인

된장과 간장에서 단백질 분해효소를 생산하는 균주 27종을 분리하였다. 이들을 배양하여 단백질 분해효소를 가장 많이 생산하는 균주 3종을 분리하고, 이를 각각 TH1-1, TH1-3,

Table 2. Identification result of isolated strains

Name	Gene	Match	Total	Pct (%)
TH1-1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	929	932	99
TH1-3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> strain CICC 10078 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	930	935	99
TH2-1	<i>Bacillus subtilis</i> strain DmB4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	920	928	99



Fig. 1. Comparison of 16r RNA full sequencing to RNA database (NCBI, RDP, and ERRD).

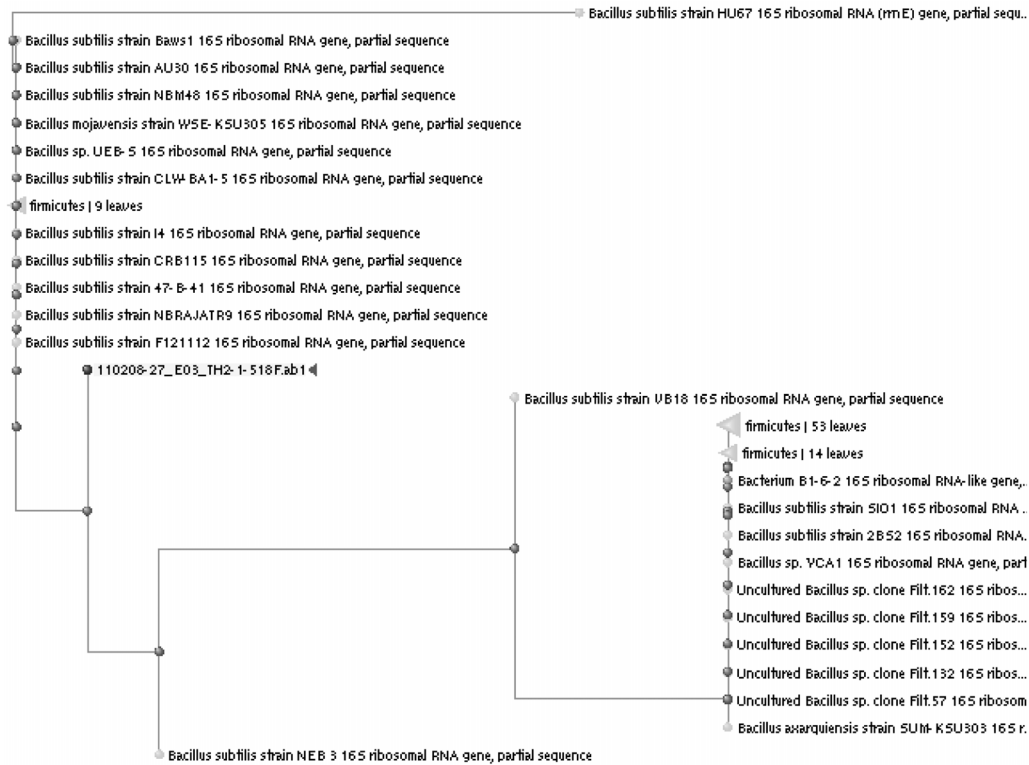


Fig. 2. Phylogenetic tree of *Bacillus subtilis* sp. TH2-1.

TH2-1로 명명하였다. 가장 분해력이 우수한 효소를 생산하는 TH1-1을 동정한 결과 *Bacillus subtilis*일 확률이 99%인 것으로 도출되었다(Table 2). 16s rRNA full sequencing한 결과와 phylogenetic tree는 각각 Fig. 1, 2와 같다.

### 3.1. 단백질 분해효소의 활성 확인

미생물 배양 후 균주별, 단백질 분해효소의 활성을 확인하는 실험으로 clear zone의 크기를 통해 효소활성 정도를 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 분리된 균주 중 *Bacillus subtilis* sp. TH1-1의 경우, 35°C에서 clear zone의 반경이 가장 높은 것으로 확인되었다. 비교한 결과는 clear zone의 크기가 배

양온도 별 35°C > 40°C > 25°C > 30°C > 20°C의 순으로 결과가 확인되었다(Fig. 3).

*Bacillus subtilis* sp.에 의해 생성되는 단백질 분해효소는 여러 온도 조건에서 활성이 있음이 확인되었고, 이는 여러 분야에서 예를 들면 식품가공, 농업 및 유기폐기물 처리 자원화 등 다양한 분야에서 적용 가능성이 있음을 시사하고 있다.

간장에서 분리된 *Bacillus subtilis* sp. TH2-1의 경우에도 35°C에서 clear zone의 크기가 가장 크게 나왔으며 35°C > 30°C > 25°C > 20°C > 40°C 순으로 clear zone 반경의 크기가 가장 높았으므로, TH2-1의 protease는 35°C에서 활성이 가장 높았다(Fig. 4).

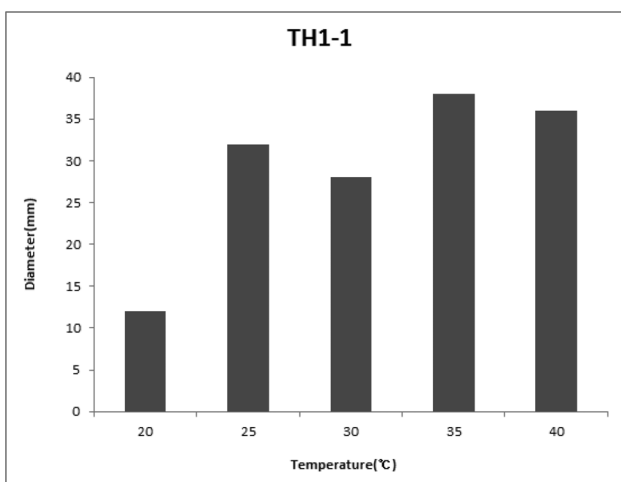


Fig. 3. The clear zone sizes on the plate at variable temperatures.

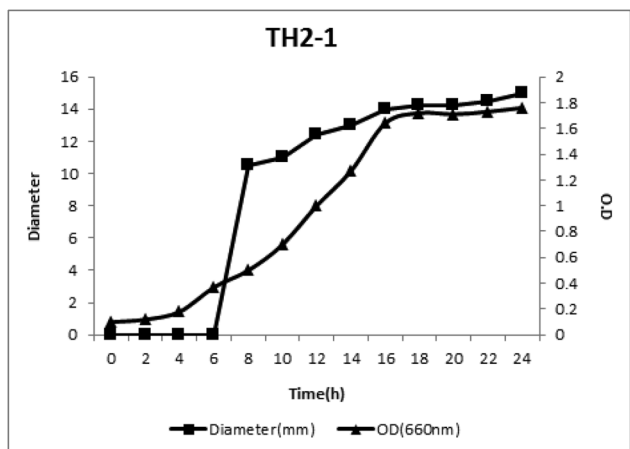


Fig. 4. The clear zone sizes on the plate at variable temperatures.

**Table 3.** Comparison of the clear zone sizes made by variable microorganisms at different temperatures

Clear zone size	1st	2nd	3rd	4th	5th
Strain No./°C	TH1-1/35	TH1-1/40	TH1-3/25	TH1-1/25	TH1-1/30

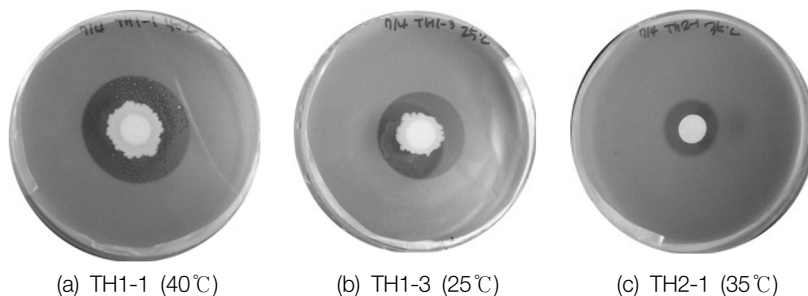
### 3.2. 온도에 따른 클리어 존 크기 비교

각 온도별 균주의 protease활성을 비교해보면 25°C~40°C에서 TH1-1과 TH2-1의 클리어 존 크기가 가장 컸다(Fig. 3, 4). 이로서 분리된 균주 중 TH1-1의 protease활성이 가장 높다고 볼 수 있다. Table 3에는 균주 별 온도별 생성된 clear zone의 크기를 통해 단백질분해효소의 활성을 비교하였다. 본 연구의 목적은 여러 가지 온도조건에서 활성이 있는 단백질분해효소를 생성하는 미생물을 분리하여 다양한 산업분야에 적용하는 데에 있으므로, 균주와 활성 온도 조건에 중점을 두고 분석하였다.

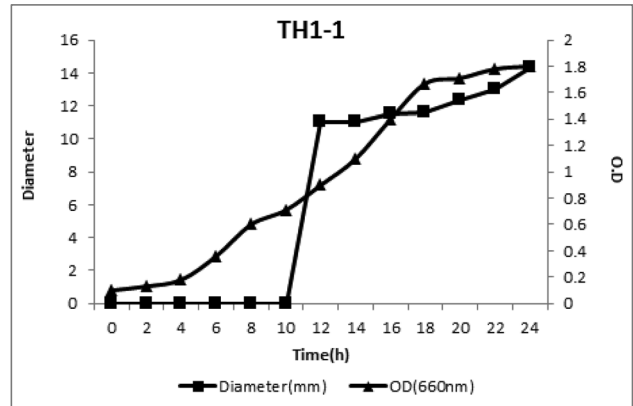
### 3.3. 균주의 배양시기별 생산된 효소의 활성도

분리된 3종의 미생물세포들을 배양하면서, 2시간 간격으로 시료를 채취하고, 원심분리 후 상등액에 포함되어 있을 세포외효소의 활성을 측정하기 위해 clear zone의 크기를 측정된 결과 각 균주 별, 배양시간별, 단백질 분해효소의 활성을 비교한 결과는 Fig. 6~8의 diameter와 같다. 이 결과를 Fig. 6~8의 growth curve와 비교해보면 단백질 분해효소는 세포의 생장이 활성화되면서 생성되므로 일차대사 산물로 사료된다. 그러나 *Bacillus subtilis* TH1-1, 1-3과 2-1 모두 생장이 일어나고 약간 늦은 시기에 clear zone이 확인되었는데, 이는 clear zone을 육안으로 확인하는데 기인한 것으로 보인다. 일정 크기 이상의 clear zone이 생성되어야 육안으로 확인이 가능하기 때문이다. 확인된 후에는 clear zone이 지속적으로 생성되었음이 확인되었다.

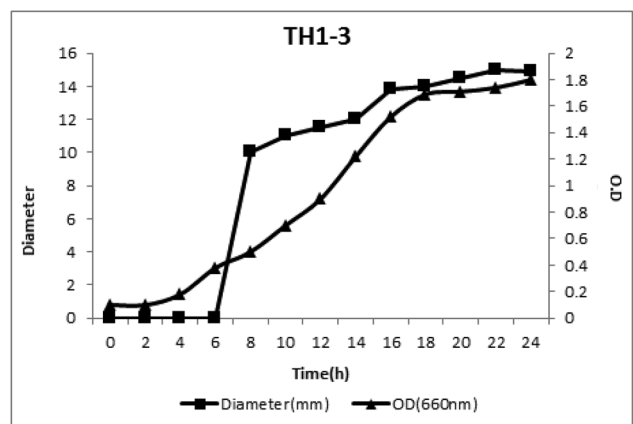
Clear zone이 생성되는 시간을 살펴보면 TH2-1이 4시간만에 반응을 나타내기 시작했다. 즉 가장 빠른 시간 안에 단백질가수분해효소를 생산한다고 보인다. 이를 산업에 응용가능한 공학적 관점에서 보았다. 최종적인 diameter의 크기는 TH1-1, TH1-3, TH2-1 모두 14 mm전후이므로 활성도에는 별다른 차이가 없는 것을 확인할 수 있다. 그러므로 산업적인 관점에서 TH2-1이 가장 빠른 시간 안에 목적물질을 빨리 생산할 수 있음을 나타내므로 산업화시기에 가장 유용한 미생물로 생각된다.



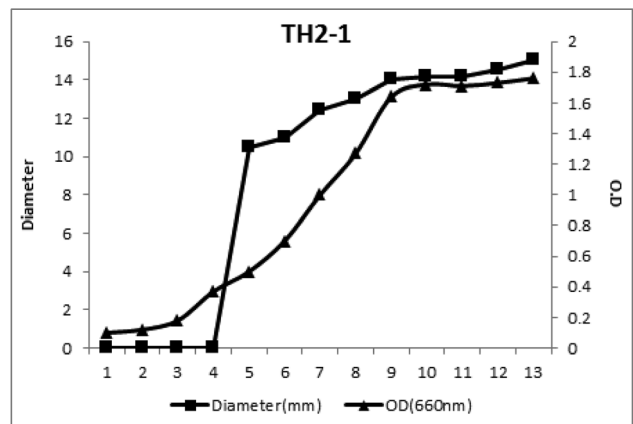
**Fig. 5.** Protease activity and clear zone.



**Fig. 6.** Microbial growth curve and clear zone size of TH1-1.



**Fig. 7.** Microbial growth curve and clear zone size of TH1-3.



**Fig. 8.** Microbial growth curve and clear zone size of TH2-1.

본 연구실에서 분리된 미생물에는 단백질분해효소가 생산되고 있음이 확인되었다. 이러한 효소들은 유기성 폐기물을 분해하여 적용할 수 있는 비료산업 분야 등 여러 산업분야에서 수요가 높다. 또한 지속적으로 보다 온난한 조건에서 분해효율이 높은 효소에 대한 연구와 개발이 이루어지고 있다. 효소의 높은 안정성은 전체 공정의 생산성은 물론, 비용절감 등 경제적인 면에서 매우 중요한 요소가 되고 있다. 이는 공업적 규모의 활용측면에 많은 장점이 있는 미생물들과 효소에 지속적으로 연구되어져야 하는 이유도 되고 있다. 본 연구실에서는 여러 가지 발효 제품에서 다양한 종류의 세균과 효모 등을 분리하였는데, 이들이 생산할 수 있는 효소들은 많은 가능성을 보이고 있다. 본 연구에서는 이들 효소들의 가능성을 확인하고 적용하는 데 필요한 결과를 확인하였다. 균주의 효소 생산성을 높이고, 적용 분야를 찾는 연구가 후속된다면 다양한 분야의 산업분야에 유용할 것으로 사료된다.

KSEE

## 사사

본 연구는 2013년도 서경대학교 교내연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

## Reference

1. An, T. H., Kang, J. Y., Park, S. Y., Jang, S. W. and Lee, Y. S., "Application of Liquid Amino-fertilizer for Greenup Promotion during Spring Season," *Kor. Turfgrass Sci.*, **24**(1), 36~44(2010).
2. Kim, K.-P., Kim, N.-H., Rhee, C.-H. and Woo, C.-J., "Isolation and Characterization of Protease Producing Bacteria from Soil," *Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **31**(5), 754~759(2002).
3. Lim, S.-I. and Yoo, J.-Y., "Purification and Characteristics of Protease Produced by *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2 from Korean Traditional Meju/Seong-II Lim J.," *Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**(5), 1010~1016(1999).
4. Choi, B.-B., "Enzymatic properties of *Serratia marcescens* protease," *Kor. J. Food Nutr.*, **16**(2), 152~157(2003).
5. Hwang, J.-Y., Choi, S.-H., Lee, S.-K. and Kim, S.-M., "Optimal Conditions for the Production of Salt-tolerant Protease from *Aspergillus* sp. 101 and Its Characteristics," *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **38**(11), 1612~1617(2009).
6. Bos, S. J., Approaches to the isolation of an unidentified microbial product, In Verrall, M. S. 9 editor, *Discovery and Isolation of Microbial Products*. Ellis Horwood Publishers, Chichester, U.K., pp. 32~51(1985).
7. Cheetham, P. S. J., Microbial screening, selection and strain improvement. In: Bu'Lock, J. and B. Kristiansen (editors). *Basic Biotechnology*. Academic Press, London. pp. 217~251 (1987).
8. Vandamme, E. J., Antibiotic search and production: an overview. In Vandamme, E. J. (editor) *Biotechnology in industrial antibiotics*. Marcel Dekker, New York. pp. 3~31(1984).
9. Massaki, M., Hiromi, D., Toshifume, T., Satoru, M., Yasut-sugu, S. and Tadayuki, I., "A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38," *J. Bacteriol.*, **175**, 6459~6466(1993).
10. Atkinson, B. and Mavituna, F., *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, 3rd ed., Stockton Press, New York (1991).
11. Bailey, J. E. and Ollis, D. F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York(1986).