

고온성 세균의 β -Galactosidase에 관한 연구 (I)

— 분리고온균의 생리적 특성 —

李鍾秀, 吳萬鎮, 李錫健, 金燦祚

(忠南大學校 農科大學)

(1982년 10월 25일 수리)

Studies on the β -Galactosidase from Thermophilic Bacterium

— Physiological Characteristics of the Selected Thermophile —

Jong Soo Lee, Man Jin Oh, Seuk Keun Lee, and Chan Jo Kim

(College of Agriculture, Chungnam National University)

(Received October 25, 1982)

This experiment was carried out to elucidate the thermotolerant properties of a thermophilic bacterium which isolated from soils of the hot springs area and selected for the β -galactosidase production. Biochemical and physiological characteristics of this strain were studied, including the investigation on the fatty acid composition for its neutral fats.

The results obtained were summarized as follows.

1. This bacterium was identified as a strain belong to the genus *Thermus*.
2. Optimal temperature and pH for growth of this strain were 65°C and pH 6.5 respectively, and it was found to be an absolute thermophilic bacterium which could not grow at 37°C.
3. No growth was obtained in the medium which contained more than 1.0% of sodium chloride.
4. The tolerable concentration of antibiotics were 10ug of penicillin G per ml of medium and 0.5ug of chloramphenicol per ml respectively.
5. This strain had autotrophic requirements for calcium-pantothenate and pyridoxine-HCl as an-essential factor and for niacin as a stimulative factor.
6. Fatty acid composition of neutral fats of the strain was palmitic acid, 60.20%; lauric acid, 11.8%; myristic acid, 7.56%; behenic acid, 4.25%; capric acid, 1.77%; stearic acid, 2.13%; arachidic acid, 1.53%; and others unidentified, 10.7%.

우유 및 유제품은 고단위 영양식품으로 오래전 부터 이용되어 왔으며 근래 식생활의 향상과 더불어 매년 그 소비량은 증가하고 있다.

우유 중에는 유당의 함량이 높아 성인과 유아 특히 동양인에 있어서는 乳糖不耐症^{1,2}으로 소화의 어려움과 설사등을 일으키고 병과류에서는 유당의 재결정이 석출되어³ 품질을 저하시키는 원인이 되고 있다. 그러므로 유제품중의 유당함량을 낮추기 위하여 β -galactosidase의 처리가 요망되어지게 되었다.

β -galactosidase (EC 3, 2, 1, 23)는 유당을 glucose와 galactose로 분해하는 효소로서 가공과정 중의 효소처리는 우유중의 유당섭취 가능성을 높일 수 있는 동시에 소화제로서 이용되기 때문에 미생물 기원의 β -galactosidase에 관한 연구가 활

발히 진행되어 왔다⁴.

β -galactosidase를 분비하는 미생물로서는 세균, 효모, 곰팡이 등이 있으나 세균에 있어서는 활성은 높으나 균체의 수율이 낮고 곰팡이에 있어서는 균체의 수율은 높지만 활성이 낮아 효소 생산에 각기 장단점을 가지고 있다고 보고된 바 있다⁵. 또한 본 효소에 관한 연구로서는 1951년 Cohn등⁶에 의하여 *E. coli*의 β -galactosidase의 연구가 시작된 이래 *Streptococcus lactis*⁷, *Staphylococcus aureus*⁸, *Bacillus subtilis*⁹, *Bacillus* sp.¹⁰, *Lactobacillus bulgaricus*¹¹, *Aspergillus oryzae*^{12,13}, *Penicillium citrinum*¹⁴, *Sclerotium tuliparum*¹⁵, *Pycnoporus cinnabarinus*¹⁶ 등의 중온성 미생물을 대상으로 연구가 주로 이루어졌다.

※ 본 연구는 1980년도 문교부 학술 연구조성비에 의하여 이루어진 논문임.

고온성 세균이 분비하는 효소는 일반적으로 내열성이고 불용화에 적당하여 효소의 재사용이 가능할 뿐만 아니라 고온환경하에서 생육하는 미생물의 생명현상을 규명하기 위하여 근래 고온균을 대상으로한 연구가 활발히 진행되고 있다⁽¹⁷⁾. 고온균 중에서 β -galactosidase를 분비하는 균주는 *Thermus aquaticus*,⁽¹⁸⁾ *Bacillus stearothermophilus*⁽¹⁹⁾, *Thermus thermophilus*⁽²⁰⁾와 *Bacillus acidocaldarius*⁽²¹⁾ 등이 알려져 있다. 한편, 고온균의 내열기구를 해명하기 위한 연구로서는 균체성분에 관한 연구^(22~25), 생리적 특성에 관한 연구^(26,27)와 금속이온의 보호효과^(28~42) 등이 있으며 특히 균체성분중 지방산조성의 특성이 고온균의 내열요인으로 주목되어 많은 연구가 진행되어 왔다⁽⁴³⁾.

필자들은 내열성의 β -galactosidase를 분비하는 유용균주를 선별하고자 효소활성이 높은 고온균을 토양으로부터 분리하여 동정하고 몇가지 생리적 특성을 검토하고 그 균체 지방산 조성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

고온균의 분리

온천, 퇴비 및 토양의 분리원을 표 1의 조성을 가진 액체배지에 접종하여 65°C에서 48시간, 2회 반복하여 集積培養한 후 고체배지에 塗抹한 다음, 60°C에서 48시간 배양하여 집락을 분리하였다.

공시균주의 선정

선정방법 : 표 1의 액체배지를 진탕시험관에 10ml씩 분주하여 가압살균한 다음, 분리균주를 접종하고 65°C에서 72시간 진탕배양한 후 배양액을 ultrasonic homogenizer (Nihon Seiki Kai Sha. Co.)에 20Kc로 10분간 처리하여 균체를 파쇄시킨 액의 β -galactosidase 활성을 측정하여 비교한 후, 강한 균주를 공시균주로 선정하였다.

β -galactosidase 활성의 측정 : Ulrich⁽⁴⁴⁾ 등의 방법에 준하여 5×10^{-3} M O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)의 용액 4ml에 前記의 효소 추출액 1ml를 혼합하여 65°C에서 30분간 진탕반응 시키고 0.5 M Na₂CO₃ 5ml를 넣어 효소작용을 중지시킨 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액의 흡광도를 420nm에서 측정하여 ONPG로부터 유리되는 O-nitrophenyl (ONP)

Table 1. Composition of medium for the isolation of thermophilic bacteria producing β -galactosidase (Unit:% w/v)

Poly peptone	0.4
Lactose	2.0
Yeast extract	0.1
NH ₄ Cl	0.2
KH ₂ PO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
NaCl	0.05

의 농도를 molar extinction coefficient로 계산하였다. 또한 효소활성의 단위는 반응온도 65°C에서 1분간에 유리되는 ONP의 1 μ M를 1단위로 하였다.

공시균주의 동정

공시균주로 선정된 Y-33에 대한 형태적, 배양적인 성질과 생화학적 성질의 검토는 "manual of microbiological method"⁽⁴⁵⁾와 "細菌學實習提要"⁽⁴⁶⁾에 의하였다. 또한 형태적 검경은 전자현미경 (Hitachi, hu-11-2)에 의하였으며 Bergey's manual⁽⁴⁷⁾과 Saiki 등⁽³⁷⁾의 高温菌分離同定法에 준하여 동정하였다.

공시균주의 생리적 특성

배양온도와 pH의 영향 : 48시간 前培養한 배양액 1ml를 분리용 기본배지에 접종하여 40~80°C까지 5°C 간격으로 배양한 다음, 세포를 회수하여 생리식염수에 현탁시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 생육최적온도를 검토하였고 최적온도에서 초발 pH를 5.0~8.0까지 0.5 간격으로 조절하여 이와같은 방법으로 최적 pH를 검토하였다.

NaCl의 영향 : NaCl의 농도를 0.05~5.0%로 각각 첨가한 기본배지를 이용하여 최적조건에서 上記와 같이 접종하여 배양한 후, 배양시간에 따른 NaCl 농도의 영향을 검토하였다.

항생물질에 대한 내성 : 기본배지에 penicillin G와 chloramphenicol을 0.5~50 μ g/ml 농도로 millipore filter로 濾過除菌하여 첨가시킨 후 최적조건에서 배양하면서 24, 48시간에서 생육 유무를 검토하였다.

Vitamin 요구성 : 飯塚 등⁽⁴⁸⁾의 방법에 따라 질소원을 asparagine과 ammonium sulfate로 한 Wickerham 합성배지⁽⁴⁹⁾의 vitamin 결핍배지를 기본배지로 하고 biotine, Ca-pantothenate, folic acid, in-

ositol, niacin, p-aminobenzoic acid, pyridoxine-HCl, riboflavin 및 thiamin-HCl 등의 vitamin을 생략법과 단독시험법으로 각각 소정량씩 첨가한 배지 10ml에 공시균주의 현탁액 0.1ml를 접종하여 65°C에서 5일간 진탕 배양하면서 24시간마다 660nm에서 흡광도를 측정하여 그 요구성이 절대적, 자극적 또는 비요구성인가를 판정하였다⁴⁸⁾. 접종균주는 기본배지에 48시간 前培養한 배양액 중의 세포를 회수하여 멸균된 생리식염수로 3회 세척한 후 접종되는 균 수가 약 2500/ml 개가 되도록 희석하여 접종하였다.

공시균의 균체지방산 조성

유지의 추출 및 지방산의 methyl ester화: Jar fermenter에서 수확한 균체를 Charles 등⁵⁰⁾의 방법으로 acetone과 chloroform-methanol(2:1, v/v) 혼합액으로 유지를 추출하고 Folch 등⁵¹⁾의 방법에 따라 비유지물질을 제거시켰다. 다음 3N-alcoholic KOH로 12시간 비누화시킨 후, H₂SO₄ 산성으로 하여 petroleum ether로 추출한 다음, "일본유지 및 유제품시험법"⁵²⁾에 따라 methyl ester화 하였다. 즉 상기 시료를 냉각기가 부착된 플라스크에 넣고 H₂SO₄-benzene-methanol(1:30:90, v/v/v) 용액을 가하여 용해시키고 시험관을 밀봉하여 2.5시간 비등시켜 methyl화시킨 다음 냉각한 후 증류수 100ml를 가하고 다시 petroleum ether 50ml를 넣어 충분히 진탕한 다음 지방산 methyl ester를 분리시켜 anhydrous Na₂SO₄로 탈수시킨 후 N₂ gas로 농축시켜 지방산 분석시료로 하였다.

Table 2. Operating condition of gas chromatography.

Instrument	Shimazu GC-4BM
Detector	Flame ionization detector
Column	3m×3mm glass column
Supportor	5% SE-30/chromosorb. w. (60~80 mesh)
Injection temp.	250 °C
Detector temp.	250 °C
Column temp.	initial 80°C, final 230 °C
Program rate	5 °C/min.
Carrier gas	N ₂ gas 40 ml/min
Sensitivity	10 ⁻² range
Sample size	1 μl
Chart speed	10mm/min.

지방산 조성의 검정 및 정량: 상기 방법에 따라 조제된 지방산 methyl ester를 표 2의 조건으로 gas chromatography에 의하여 표준 지방산과 공시균주의 지방산 조성을 비교·검토하였고, 표준지방산 peak와 시료의 각 peak의 면적을 반쪽치법으로 계산한 후 비교면적법에 의하여 균체 지방산의 함량을 표시하였다.

결과 및 고찰

공시균의 분리 및 동정

기본배지를 이용하여 65°C에서 생육한 분리균주의 β -galactosidase 생산능을 검토한 결과, 분리균주의 2~3%가 효소생산능을 가지고 있었으며 이들 가운데 온천토양으로부터 분리한 Y-33 균주가 효소생산능이 가장 강하여 공시균주로 선정하였으며 배양액의 효소역가는 8.5u/ml이었다. 선정된 Y-33 균주의 형태적, 배양적 및 생 화학적 특성과 당 이용성 등의 균학적 성질을 검토한 결과는 표 3, 4, 5, 6 및 사진 1, 2와 같으며 Y-33 균주는 장간균으로 0.7~1.2×2.1~4.5μ의 크기 이었고 gram 음성, 비운동성이었다.

Table 3. Morphological characteristics of the selected thermophile.

Form	Rod
Size	0.7~1.2×2.1~4.5μ
Motility	Non motile
Gram stain	Negative
Flagella	None

Table 4. Cultural characteristics of the selected thermophile.

Nutrient broth (1% glucose)	Positive
" (in 7% NaCl)	Non positive
Nutrient broth	Positive
Nutrient agar slant	"
Glucose nutrient agar slant	"
Glucose nitrate agar	Non growth
Peptone water	Positive
Koser's citrate agar	Non growth
Temp. for growth	45~75°C
pH for growth	pH 5.5~7.5

Table 5. Biological characteristics of the selected thermophile.

Hydrolysis of casein	-
Coagulation of milk	+
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of gelatin	+
Indole test	-
Production of H ₂ S	+
Urease test	+
Reduction of nitrate to nitrite	+
Vogez-Proskauer test	-
Catalase	-
Oxidase	-
Amylase	+

Table 6. Utilization of carbohydrates and related carbon compounds by the selected thermophile.

Arabinose	+	Sucrose	+
Xylose	+	Lactose	+
Glucose	+	Trehalose	+
Mannose	+	Sorbitol	-
Salicin	-	Mannitol	+(weak)
Galactose	+	Inositol	+(weak)
Maltose	+	Cellulose	-
Fructose	+	Inulin	-
Starch	+	Dextrin	+
Glycerol	+(weak)		

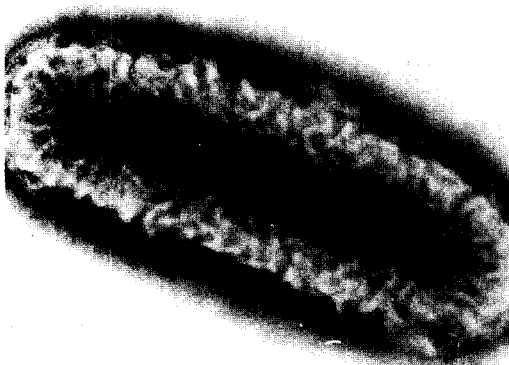


Photo 1 (x 27000)

생육온도가 45~75°C인 점과 전분 액화력과 urease 활성이 양성인 점, catalase와 indole test 가 음성인 점으로 보아 본 균주는 *Thermus* sp. 로 인정되었다. 생육 최고온도는 타 고온균에 비하여 다소 낮은편이었으며 색소 생산능이 인정되었다. 이는 고온균의 일반적인 성질인 gram 음성이고 색소를 생산하는 점과 일치하는 결과이며 Saiki 등⁽⁹⁷⁾이 분리한 *Thermus* sp.와 비슷한 형태이었다. *Thermus* sp.에 대하여는 *Bergey's manual*에 의하면 *Thermus aquaticus*가 인정되었을 뿐 분류학적 체계가 확립되지 않아 비교하기 어려운 점이 있었으므로 생리적 성질에 대한 검토가 더욱 요망된다.

공시균주의 생리적 특성

생육에 미치는 배양온도와 pH: 공시균주의 최적 생육온도를 검토하기 위하여 기본배지에 선정 균주를 접종하고 40~80°C 범위의 온도에서 5°C 간격으로 진탕배양한 후의 생육도를 흡광도로 표시한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는 바와 같이 선정균주는 45°C 이하와 75°C 이상에서는 거의 생육하지 않았으며 생육 최적온도는 65°C이었다.

이는 Fuji 등이⁽⁹⁸⁾이 분리한 *Thermus* sp.보다 5~10°C 낮은 온도이었으나 37°C에서 생육하지 않는 점으로 보아 절대고온균이라 하겠다.

한편 기본배지의 pH를 5.0~8.0까지 0.5간격으로 조정하여 최적 온도인 65°C에서 2일간 배양한 결과, 공시균주인 *Thermus* sp.의 생육에 가장 알맞는 pH는 6.5~7.0으로 중성부근이었으며 pH 5.5 이하와 7.5 이상에서는 생육하지 않았고 pH에 매

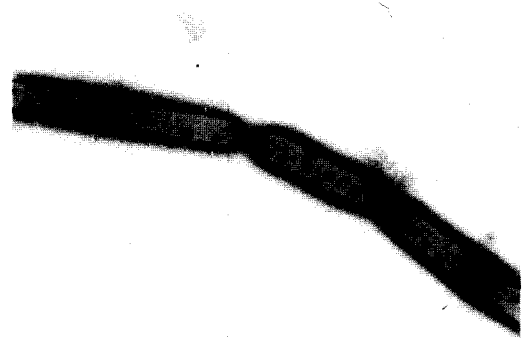


Photo 2 (x 3500)

Photo 1, 2. Electron micrograph of the selected strain.

The cell was cultured in basal medium for 16 hrs at 65°C.

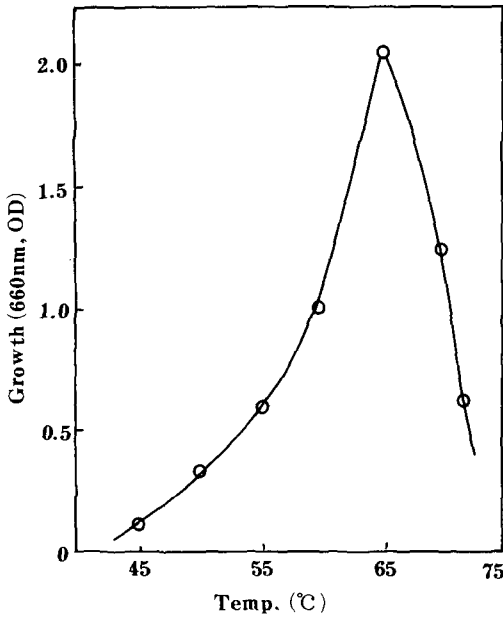


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Thermus sp.*

우 민감함을 알 수 있었으며, Saiki 등⁽³⁷⁾이 분리한 *Thermus sp.*의 최적 pH는 7.0~7.5이고 pH 6.0 이하와 9.0 이상에서는 생육하지 않았다는 점과 비교하여 볼 때 다소 차이가 있었다.

생육에 미치는 NaCl 농도의 영향: NaCl의 농도가 공시균주의 생육에 미치는 영향을 검토하기

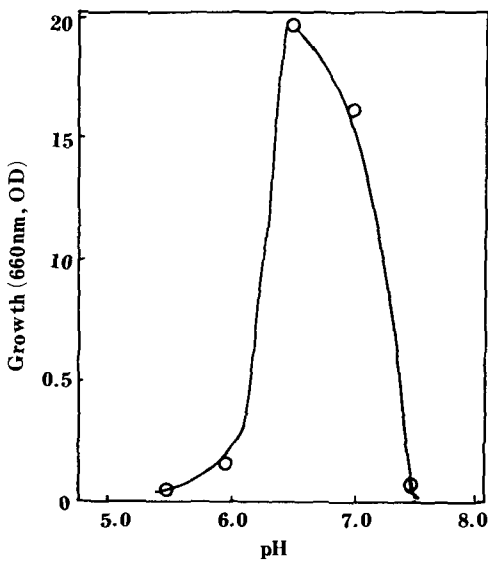


Fig. 2. Effect of pH on the growth of *Thermus sp.*

위하여 기본배지에 NaCl 농도를 0.05~5.0%로 각각 조절한 후 배양 10, 20, 30, 40 시간마다 각 농도별 생육도를 측정한 결과는 그림 3과 같다.

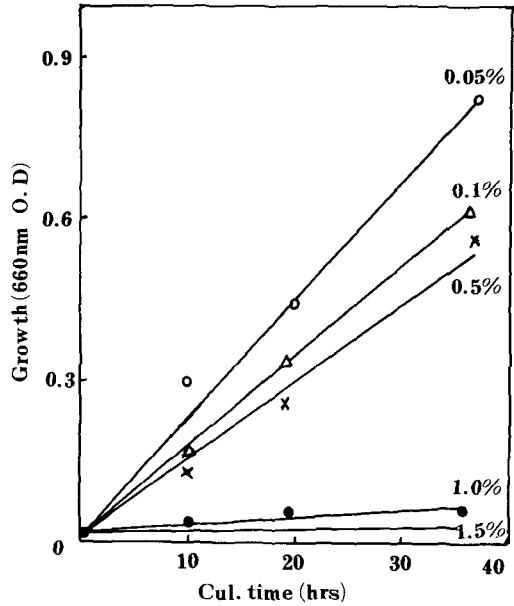


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the growth of *Thermus sp.*

그림 3에서 보는 바와 같이 NaCl의 농도가 높아짐에 따라 생육이 저하 되었고 특히 NaCl 1.0% 이상에서는 생육되지 않았다. 이는 Saiki 등이⁽³⁷⁾이 분리한 *Thermus sp.*와 비교하여 볼 때 1% 정도 낮은 농도이었다.

항생물질에 대한 내성: penicillin G와 chloramphenicol에 대한 공시 균주의 내성을 검토한 결과는 표 7과 같다.

Table 7. Sensitivity of *Thermus sp.* to concentration of antibiotics. (Unit: μ g/ml)

	Conc. of antibiotics						
	50	25	10	5	1	0.5	0
Penicillin G	-	-	±	+	+	+	+
Chloramphenicol	-	-	-	-	-	±	+

(- : no growth, ± : slight growth, + : good growth)

표 7에서 보는 바와 같이 penicillin G는 공시 균주에 대하여 10 μ g/ml, chloramphenicol은 0.5 μ g/ml 이상에서 생육이 저해되었다.

이는 Saiki 등이⁽³⁷⁾ *Thermus sp.*의 항생물질

에 대한 내성은 chloramphenicol은 10 μ g/ml에서 생육하였다는 보고와 비교하여 볼 때 분리균주는 내성이 약하였으며 gram 음성인 이 균은 역시 penicillin에는 비교적 내성이 강하였다.

Vitamin 요구성: 질소원을 asparagine과 ammonium sulfate로 한 Wickerham배지에 9종의 공시 vitamin을 사용하여 생략법과 단독시험법으로 그 요구성을 검토하여 균체의 생육도를 흡광도로 표시한 결과는 표 8 및 9와 같다.

표 8에서와 같이 분리균주는 Ca-pantothenate

와 pyridoxine-HCl를 절대적 생육인자로 요구하였으며 niacin을 자극적 인자로 요구함을 알 수 있었다. 이 결과는 표 9에서와 같이 공시 Vitamin의 단독시험법에서도 같은 결과를 보였다. 한편 질소원으로는 asparagine이 ammonium sulfate보다 생육에 더 적합하였다. 또한 Saiki 등은³⁷⁾ *Thermus flavus* 균이 biotine, folic acid, P-aminobenzoic acid를 자극적 인자로 요구한다고 보고하였고 Fuji 등이³⁶⁾이 분리한 Acidothermophilic bacteria는 생육인자로서 biotin을 절대적으로 요구

Table 8. Vitamin requirement in the Wickerham's complete medium for the growth of *Thermus* sp. (Unit:O. D)

Nitrogen source	Media No.										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asparagine	0.02	1.43	1.08	0.05	1.00	1.06	0.19	1.08	0.05	1.27	1.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.00	0.85	0.82	0.03	0.94	1.02	0.04	1.00	0.03	0.98	0.99

Media No. 0 : Vitamin free Wickerham medium with ammonium sulfate or asparagine.

1 : Wickerham's complete medium.

2 : " " omitted biotin.

3 : " " " Ca-pantothenate.

4 : " " " Folic acid.

5 : " " " Inositol.

6 : " " " Niacin.

7 : " " " P-aminobenzoic acid.

8 : " " " Pyridoxine-HCl.

9 : " " " Riboflavin.

10 : " " " Thiamine-HCl.

Table 9. Vitamin requirement in Wickerham's basal medium for the growth of *Thermus* sp. (Unit : O. D.)

Nitrogen source	Media No.						
	1	2	3~4	5	6	7	8~9
Asparagine	0	0.85	0	0.10	0	0.94	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0.04	0	0.03	0	0.03	0

Media No. 1 : Wickerham's basal medium with biotin.

2 : " " Ca-pantothenate.

3 : " " folic acid.

4 : " " inositol.

5 : " " niacin.

6 : " " P-amino benzoic acid.

7 : " " pyridoxine-HCl.

8 : " " riboflavin.

9 : " " thiamine-HCl.

한다는 보고 등을 볼 때 본 분리균주와 다소 차이점을 나타내었다.

공시균주의 균체 지방산 조성

β -galactosidase 생산용 배지에서 배양하여 수확된 균체를 chloroform-methanol(2:1, v/v) 혼합액에 현탁시켜 초음파 균체 파쇄기로 파쇄시키고 2~3회 동일 유기용제로 유지를 추출한 후, 비누화하고 methyl ester화하여 gas chromatography로 분석한 결과는 그림 4 및 표 10과 같다.

그림 4와 표 10에서 보는데와 같이 공시균주의 균체 지방산 조성은 palmitic acid 60.2%, lauric acid 11.8%, myristic acid 7.56%, behenic acid 4.25%, capric acid 1.77%, stearic acid 2.13%, arachidic acid 1.53%이었다. *Bacillus* sp.의 균체 지방산⁽³³⁾은 탄소수 14~17까지가 주로 분포하고 있는데 반하여, 본 공시균주는 지방산이 고루 분포하고 있으며 palmitic acid가 60% 이상을 차지하고 있었다. 이는 Daron 등⁽²⁸⁾이 분리한 Thermophilic *Bacillus* sp.이 탄소수 16인 palmitic

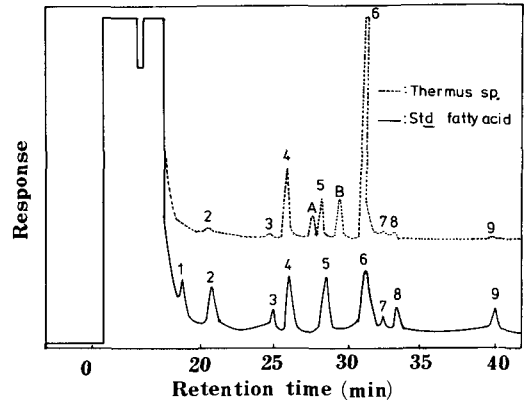


Fig. 4. Comparison of gas chromatogram in standard fatty acid and *Thermus* sp.

- 1. Caproic acid 2. Caprylic acid
- 3. Capric acid 4. Lauric acid
- 5. Myristic acid 6. Palmitic acid
- 7. Stearic acid 8. Arachidic acid
- 9. Behenic acid

(A,B) -unidentified

Table 10. Composition of fatty acid in triglyceride of *Thermus* sp. and *Bacillus* sp. (%)

	Fatty acid								
	n-8:0	n-10:0	n-12:0	n-14:0	i-14:0	i-15:0	a-15:0	n-16:0	i-16:0
<i>Thermus</i> sp.	T	1.77	11.8	7.56				60.2	
<i>Bacillus</i> sp. (Mesophile)				T	1.6	57.4	22.7	1.2	3.5
	i-17:0	a-17:0	i-17:1	n-18:0	n-20:0	n-22:0	(A)	(B)	
<i>Thermus</i> sp.				2.13	1.53	4.25	4.08	6.68	
<i>Bacillus</i> sp. (Mesophile)	6.7	4.8	2.1						

The fatty acids are abbreviated as the number of carbon atoms prefaced with i for isobran-
ching, a for anteiso-branched, n for unbranched,
or followed by : 1 for monoenoic fatty acid.
T is less than 1%.

acid를 제일 많이 함유하고 있으며 배양온도를 40℃에서 60℃로 높임에 따라 그의 함량이 증가하였다는 보고와 비슷한 결과이었으며 Brock⁽²⁴⁾ 등이 열안정성이 높은 고온균일수록 포화 및 측쇄 지방산의 함량이 증가하였다는 보고에 비추어 볼 때 타당한 결과이었으며 Ray 등⁽²²⁾은 분리한 *Thermus* sp.가 70℃ 배양 되었을 때 n-C₁₆과 i-C₁₆ 및 i-C₁₇ 지방산이 주를 이루었다는 보고와 비슷한 결과이었다.

요 약

고온균의 생리적 특성과 내열기구에 관한 기초 자료를 얻고자 온천토양에서 β -galactosidase를 생산하는 고온균을 분리하여 동정하고 몇가지 주요한 생리적 특성을 검토하였으며, 그의 균체 지방산 조성을 gas chromatography로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. β -galactosidase를 생산하는 공시균주는 *Thermus* sp.으로 동정되었다.

2. 분리선정한 균주의 최적 생육온도는 65℃이었고, 37℃에서 생육하지 않는 절대고온균이었으며 최적pH는 6.5 내외이었고 pH에 민감하였다.

3. NaCl에 대한 내성은 NaCl 1% 이상에서는 생육하지 못했다.

4. 항생물질에 대한 내성은 penicillin G는 10 $\mu\text{g/ml}$, chloramphenicol은 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

5. Vitamin 요구성은 Ca-pantothenate와 pyridoxine-HCl를 절대적 생육인자로 요구하였고 niacin을 자극적 생육인자로 요구하였다.

6. 공시균주의 균체 지방산 조성은 palmitic acid 60.20%, lauric acid 11.80%, myristic acid 7.56%, behenic acid 4.25%, Capric acid 1.77%, stearic acid 2.13%, arachidic acid 1.53% 이었다.

參 考 文 獻

- Rosensweig, N. J. *Dairy Sci.* **52**, 585. (1969)
- Shukla, T. P. *CRC crit Rev.* **5**, 325. (1975)
- Rand, A. G. and P. M. Linklater. *Australian J. Dairy Technol.* **28**, 63 (1973)
- Paul, D. B. *The Enzymes*, Academic press. volume **VI**, 617. (1972)
- Wierzbicki, L. E. and F. V. Kosikowski. *J. Dairy Sci.* **56**, 26. (1971)
- Cohn, M. and J. Monad, 1951. *BBA.* **7**, 153
- Mcfeters, G. A., Sandine, W. E., and P. R. Elliker, *J. Bacteriol.* **93**, 914. (1967)
- Hengstenberg, W., Penberthy, W. K. and M. L. Morse. *European J. Biochem.* **14**, 27. (1970)
- Anema, P. J. *BBA.* **89**, 495. (1964)
- Ikura, Y. and K. Horikoshi. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 85. (1979)
- Oleary, S. and J. H. Woychik. *Applied and environmental microbiology.* **32**, 89. (1976)
- Mega, T., Y. Matsushima. *J. Biochem.* **85**, 335. (1979)
- Ogushi, S. Yoshimoto, T. and D. Tsuru, *J. Ferment. Technol.* **58**, 115 (1980)
- Watanabe, Y. Kibeoaki, Y. Takenishi, S. Sakai, K. Y. Tsujisaka. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 943. (1979)
- Sugiura, M. Suzuki, M. Shimomura, T. Sasaki, M. and M. Kurobe. *J. Ferment. Technol.* **56**, 86 (1979)
- Ohtadara, A. Hayashi, N. and M. Mitsutomi, *J. Ferment. Technol.* **59**, 325. (1981)
- 大島泰郎, 異常環境と微生物酵素 講談社 1-23. (1977)
- Ulrich, J. L. Mcfeters, G. A. and K. L. Temple, *J. Bacteriol.* **110**, 691. (1972)
- Griffiths, M. W. and D. D. Muir. *J. Sci. Food Agric.* **31**, 397 (1980)
- 山口騰成, 犬官邦雄, 山林孟清水祥一, 日本農藝化學會 講演要旨集, 昭和 54年度, 酵素 337. (1979)
- Ohmiya, K. Ohashi, H. Kobayashi, T. S. Shimizu, *Applied and environmental microbiology.* **33**, 137 (1977)
- Allen, M. B. *Bacteriol Rev.* **17**, 125 (1953)
- Amelunxen, R. E., M. Noelken, and R. Singleton, Jr. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**, 447 (1970)
- Brock, T. D. *Science.* **158**, 1012 (1967)
- Campbell, L. L., and G. B. Manning. *J. Biol. Chem.* **236**, 2962 (1961)
- Chan, H., R. H. Himes, and J. M. Akagi. *J. Bacteriol.* **106**, 876 (1971)
- Chan, M., Y. P. Virmani., R. H. Himes, and J. M. Akagi. *J. Bacteriol.* **113**, 322 (1973)
- Daron, H. H. *J. Bacteriol.* **101**, 145 (1970)
- Friedman, S. M. *Bacteriol. Rev.* **32**(1), 27 (1968)
- Gaughran, E. R. L. *Bacteriol. Rev.* **11**, 189 (1947)
- Koffler, H. *Bacteriol. Rev.* **21**, 227 (1957)
- Ray, P. H., D. C. White, and T. D. Brock. *J. Bacteriol.* **106**, 25 (1971)
- Shen, P. Y., E. Coles., J. L. Foote, and J. Stench, *J. Bacteriol.* **103**, 479 (1970)
- Singleton, R., Jr., and R. E. Amelunxen. *Bacteriol. Rev.* **37**, 320 (1973)
- Wisdom, C., and N. E. Weleker. *J. Bacteriol.* **114**, 1336 - 1345. (1973)
- Fuji, U., and S. Doi. *Agr. Biol. Chem.*, **31** (7), 817 (1967)
- Saiki T., Kimura, R., and R., and K. Arima. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2357 (1972)
- Hasegawa, A. and K. Imahor. *J. Biochem.* **79**, 469. (1976)

39. Hsiu, J., E. H. Fisher, and E. A. Stein. *Biochemistry* **3**, 61 . (1963)
40. Stein, E. A.: and E. H. Fisher. *J. Biochem.* **232**, 867. (1958)
41. Stein, E. A., J. Hsiu, and E. H. Fisher. *Biochemistry* **3**, 56 (1963)
42. Toda, H. and K. Narita. *J. Biochem.* **63**, 302. (1968)
43. *Developments in industrial microbiology.* American institution of biological science. **18**, 233 (1977)
44. Ulrich, J. L. Mefeters, G. A and K. L. Temple. *J. Bacteriol.* **110**, 691 ((1972)
45. *Manual of microbiological method.* Mcgrow-hill book Co. (1957)
46. 長谷川秀活, 細菌學實習提要, 丸善(株). 136. (1971)
47. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 8th glition. 285. The Williams Wilkino Co. Baltimore. (1974)
48. 飯塚廣, 俊藤照二, 酵母の分離同定法 61 東京大學 出版會 (1969)
49. Lodda, J. *The yeast. a taxonomic study.* North-Holland pub. (1971)
50. Cherles, K. Huston and Phillip. W, Albro. *J. Bacteriol.* **88**, 425 (1964)
51. Folch, J., H. Lees and G. H. Sloane Stanely. *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1956)
52. 油脂ずよび 油脂製品試験法令會, 脂肪酸メチルエステルの調製方法 油化學 **19**, 337 (1970)