

## *Acinetobacter calcoaceticus* C10에 의한 Cyclohexanol Dehydrogenase의 유도

박 회 동·최 선 택·이 인 구

경북대학교 농과대학 농화학과

(1986년 7월 23일 수리)

### Induction of Cyclohexanol Dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* C10

Heui-Dong Park, Sun-Taek Choi and In-Koo Rhee

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University,  
Taegu, Korea

#### Abstract

*A. calcoaceticus* C10 grown on cyclohexanol as sole source of carbon and energy produced cyclohexanol dehydrogenase(CDH) and glucose dehydrogenase (GDH) concomitantly. CDH and GDH were different in coenzyme, induction and electrophoretic patterns. CDH depended for activity on NAD<sup>+</sup> only, while GDH required NAD<sup>+</sup> or NADP<sup>+</sup> alternatively. CDH was produced in the medium added cyclohexanol, but GDH was produced in various media such as LB, LB added 0.2% glucose or cyclohexanol and cyclohexanol medium. Productivity of CDH in *A. calcoaceticus* C10 was enhanced about 8 times by the addition of 0.2% cyclohexanol to LB medium after 4 hours as much as LB medium only. Production of CDH was induced by cyclohexanol, cyclohexanone, cyclohexan-1,2-diol and cyclohexene oxide, but not induced by  $\epsilon$ -caprolactone and adipate.

#### 서 론

사이클로헥산(cyclohexane)의 산화물인 사이클로헥사놀(cyclohexanol)은 나일론의 중간원료로 뿐만 아니라 각종 도료 및 수지의 용제, 프탈산과의 에스테르로서 가소제로 널리 이용되고 있기 때문에 이들 공장의 폐수에는 상당량의 사이클로헥사놀을 함유하고 있다.<sup>1)</sup> 이러한 사이클로헥사놀은 독성이 강하여 실험적으로 동물의 간, 혈관 및 신

장장애를 일으키며<sup>2)</sup> 환경오염에 문제시되기 때문에 이를 분해할 수 있는 미생물에 관하여 많은 연구보고가 있다. Yugari<sup>3)</sup>가 처음으로 *Pseudomonas* sp.에 의해 *trans*-cyclohexan-1,2-diol이 cyclohexan-1,2-dione으로 대사된다고 보고한 후 Elliott<sup>4)</sup>는 쥐에 의해 methylcyclohexanol이 methylcyclohexanone으로 산화된다고 보고한 바 있다. 그후 Norris와 Trudgill<sup>5)</sup>은 *Nocardia globetula* CLI, Donoghue와 Trudgill<sup>6)</sup>은 *Acinetobacter* NCIB9871 및 田中<sup>7)</sup>은 *Pseudomonas* sp.에 의하여

cyclohexanol→cyclohexanone→ε-caprolactone→β-hydroxycaproate→adipate로 대사되는 경로를 밝혔다. 이들 보고의 대부분은 확산관을 통하여 사이클로헥사놀을 기체상태로 공급하면서 균을 배양하거나<sup>4,5)</sup> 아니면 0.1% 이하의 사이클로헥사놀 및 사이클로헥사논에서 자랄 수 있는<sup>6)</sup> 미생물에 대한 것들이다. 그후 李<sup>7)</sup>에 의해 0.4% 사이클로헥사놀 또는 0.5% 사이클로헥사논(cyclohexanone)을 함유한 배지에서 잘 자랄 수 있는 *Acinetobacter calcoaceticus* C10을 분리한 바 있다. 사이클로헥사놀 대사경로의 첫단계 효소인 cyclohexanol dehydrogenase(CDH)는 독성이 강한 사이클로헥사놀을 사이클로헥사논으로 산화시키는 효소로서 균에 따라 NAD<sup>+</sup>를 조효소로 하는 것<sup>8-9)</sup>도 있고 NADP<sup>+</sup>를 조효소로 하는 것<sup>9)</sup>도 있으며 사이클로헥사놀에 의해 유도되는 유도효소일 것<sup>9)</sup>이라는 보고가 있을 뿐 깊은 연구가 되어 있지 않다. *A. calcoaceticus*는 탄소원으로 포도당을 이용할 수 없으나 비특이적인 glucose dehydrogenase(GDH)에 의해 포도당을 산화할 수 있다.<sup>3,10)</sup> 유일한 탄소원으로 사이클로헥사놀을 함유한 배지에서 자란 이 균의 GDH는 기질 특이성이 넓기 때문에 glucopyranose는 물론 이와 공간구조가 유사한 사이클로헥사놀을 기질로 산화할 가능성이 있다. 그래서 본 실험에서는 *A. calcoaceticus* C10이 생산하는 GDH와 CDH의 차이를 규명함과 아울러 CDH의 생산 패턴 및 유도특성에 관하여 조사한 것을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균은 *A. calcoaceticus* C10으로서 한천 사면배지에 1개월마다 계대배양하면서 4°C에 보관하였고 배지로는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.33%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02%, yeast extract 0.05%를 120°C에서 15분간 가열살균 후 사이클로헥사놀을 0.2% 되게 첨가한 액체배지(이하 CL 배지) 및 tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%의 LB 배지를 사용하였다.

### 2. 배양방법

중배양은 LB 배지에 한천사면으로부터 1백균이를 접종하여 30°C에서 120 strokes/min의 속도로

진탕시키면서 15시간 배양하였다. 이 때 A<sub>600</sub>은 4.0 정도이다. 본 배양은 중배양액을 1% 되게 접종하여 일정한 시간동안 중배양 방법과 동일하게 배양하였다.

### 3. 생육도 측정

균의 생육도는 Bausch & Lomb사의 Spectronic 20으로 600nm 또는 650nm에서의 흡광도를 측정하여 그 값에 상당하는 건조균체의 중량으로 나타내었다. 세척한 균체를 100°C에서 건조한 건조균체 중량과의 관계는 A<sub>600</sub> 1.0이 0.63mg/ml, A<sub>650</sub> 1.0이 0.72mg/ml에 상당한다.

### 4. 효소액 조제

배양액을 원심집균하고 50mM 인산 완충액(pH 8.0)으로 2회 세척한 후 동일 완충액에 현탁시켜 영국 Ultrasonics社의 초음파 파쇄기로 5분간 처리시킨 다음 27,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 -20°C에 보관하면서 조효소액으로 사용하였다.

### 5. 효소활성의 측정

Rodriguez<sup>11)</sup>의 방법에 따라 톨루엔으로 처리한 균체 현탁액을 사용하여 다음과 같이 행하였다. 즉 배양액을 원심집균하고 100mM triethanolamine-HCl 완충액(pH 7.5)으로 세척한 후 1ml의 동일 완충액에 현탁시켜 650nm에서의 흡광도를 측정하고 여기에 10μl의 톨루엔을 첨가하여 37°C에서 30분간 진탕시킨 후 ice bath에서 냉각시킨 액에 70μl의 1M diethanolamine을 가하여 pH를 8.6으로 조절한 다음 활성을 측정하였다. 100mM의 기질(포도당 혹은 사이클로헥사놀) 0.2ml에 3.2 mg/ml의 2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride(INT), 0.4mg/ml의 phenazine methosulphate(PMS), 20mg/ml의 NAD 5 : 1 : 1 혼합액(pH 7.5) 0.5ml 및 톨루엔으로 처리한 균체 현탁액 0.8ml를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 이 반응액에 0.2N HCl 1.5ml를 가하여 반응을 중지시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소액을 사용하여 활성을 측정할 때에는 동일한 반응 혼합액에 톨루엔으로 처리한 균체현탁액 대신에 조효소액을 희석한 것 0.8ml를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. 효소의 활성은 건조균체 혹은 단백질 mg당 1분간에 520nm에서의 흡광도 증가로 환산하여 표시하였다.

6. 단백질의 정량

Bradford<sup>12)</sup>의 방법에 따라 Coomassie Brilliant Blue G-250을 사용하여 측정하였으며 표준물질로는 소의 혈청 알부민(BSA)을 사용하였다.

7. 전기영동

Davis법<sup>13)</sup>을 변형한 Williams와 Reisfeld<sup>14)</sup>의 방법에 따라 7.5% polyacrylamide 젤(125×125×2mm), Tris-barbital 완충액(pH 7.0)로 30mA에서 전기영동하였다. 활성 밴드를 관찰하기 위해 tetrazolium 염<sup>15)</sup>을 사용하여 다음과 같이 염색하였다. 50mM 인산 완충액(pH 8.0)으로써 para-nitroblue tetrazolium(NBT) 용액(1.0mg/ml), PMS 용액(0.4mg/ml), NAD 용액(3.5mg/ml)을 만들어 이들 용액을 3:1:1비로 혼합하여 여기에 100 mM이 되게 기질을 가한 액에 전기영동이 끝난 젤을 넣어 10분간 암실에서 발색시킨 후 0.7%의 초산에 보관하였다.

8. 시 약

NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, INT, NBT 및 BSA는 시그마제, 사이클로헥사놀, 사이클로헥사논 및 이들의 유도체는 東京化成製, PMS, barbital은 일본 半井製의 특급시약을 사용하였고 그 외의 시약은 시판 특급을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. *A. calcoaceticus* C10의 GDH와 CDH 비교

CL 배지에서 24시간 배양한 *A. calcoaceticus* C10을 초음파 파쇄하여 얻은 무세포 추출액과 틀루엔으로 처리한 균체 현탁액으로 GDH와 CDH의 활성을 조사한 결과 표 1과 같이 GDH와 CDH 활성이 모두 있는 것으로 나타났다. 이것이 glucopyranose와 사이클로헥사놀의 공간구조의 유사성 때문에 *A. calcoaceticus* C10의 비특이적인 aldose dehydrogenase가 사이클로헥사놀을 산화한 것이 아닌지를 검토하기 위하여 GDH와 CDH의 차이를 비교하였다.

GDH와 CDH의 조효소를 알아보기 위하여 NAD<sup>+</sup>와 NADP<sup>+</sup>에 대한 효소의 활성을 조사한 결과는 표 2와 같다. NAD<sup>+</sup> reductase 또는 NADP<sup>+</sup> reductase가 작용하면 각각 NAD<sup>+</sup> 또는 NADP<sup>+</sup>를 환원시키므로써 tetrazolium염을 환원시킬 수가 있으

Table 1. Glucose dehydrogenase(GDH) and cyclohexanol dehydrogenase(CDH) activities of *A. calcoaceticus* C10 grown in CL medium for 24hr.

Enzyme	Activity(Unit/mg)	
	GDH	CDH
Cell-free extract*	0.338	0.308
Toluenized cell**	0.248	0.216

\*Unit/mg of protein; \*\*Unit/mg of cell

Table 2. Coenzyme test for GDH and CDH in cell-free extract of *A. calcoaceticus* C10.

Coenzyme	Activity (Unit/mg of protein)	
	GDH	CDH
NAD <sup>+</sup>	0.361	0.298
NADP <sup>+</sup>	0.353	0.021

\*NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> reductase activities were not detected under the conditions of this study.

나 본 실험조건에서 NAD<sup>+</sup> reductase와 NADP<sup>+</sup> reductase의 활성은 거의 없었다. CDH의 조효소에 관한 연구로는 Stirling<sup>9)</sup>에 의해 *Nocardia* sp.의 경우 NADP<sup>+</sup>를, Donoghue와 Trudgill<sup>10)</sup>, 및 김<sup>11)</sup>에 의해 *Acinetobacter* sp.와 田中<sup>12)</sup>에 의해 *Pseudomonas* sp.가 NAD<sup>+</sup>를 조효소로 한다고 알려져 있다. 본 실험에 사용한 *A. calcoaceticus* C10 역시 CDH는 NAD<sup>+</sup>만을 조효소로 이용하였으며 NADP<sup>+</sup>를 거의 이용하지 못하였으나 GDH는 NAD<sup>+</sup>와 NADP<sup>+</sup> 두 가지를 모두 이용하였다.

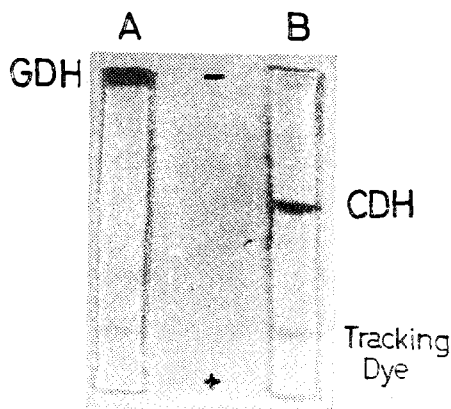
LB 배지, 0.2% 포도당 또는 사이클로헥사놀을 첨가한 LB 배지 및 CL 배지에서 균을 24시간 배양후 GDH와 CDH의 활성을 조사한 결과 GDH는 사이클로헥사놀을 첨가한 것과 첨가하지 않은 모든 배지에서 생산되었으며 그 중에서 0.2%의 포도당을 첨가한 LB 배지에서 활성이 가장 높았다. CDH는 0.2% 사이클로헥사놀을 첨가한 LB 배지에서 활성이 가장 높았으며 사이클로헥사놀을 첨가한 배지에서는 CDH가 생산되었으나 첨가하지 않은 배지에서는 거의 생산되지 않았다(표 3).

CL 배지에서 24시간 배양한 *A. calcoaceticus* C10을 초음파 처리하여 얻은 무세포 추출액을 7.5% polyacrylamide 젤로 전기영동하여 활성 밴드를

**Table 3.** GDH and CDH activities in cell-free extract of *A. calcoaceticus* C10 grown in various media for 24hr.

Medium	Activity (Unit/mg of protein)	
	GDH	CDH
LB	0.473	0.026
LBG*	0.555	0.011
LBC**	0.453	0.342
CL	0.336	0.307

\*LB+0.2% glucose; \*\*LB+0.2% cyclohexanol



**Fig. 1.** Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of GDH and CDH of *A. calcoaceticus* C10 grown in CL medium for 24hr. Enzyme activity was detected by dipping the gel in a medium containing 100mM D-glucose(A) or cyclohexanol(B), 0.6mg/ml of NBT, 0.08mg/ml of PMS, 0.7 mg/ml of NAD and 50mM phosphate buffer(pH8.0)

조사한 결과는 그림 1과 같다. GDH와 CDH는 서로 다른 위치에서 활성 밴드가 관찰되었으며 GDH는 CDH에 비하여 상당히 낮은 이동도를 보였다. GDH의 동일한 위치에서 약한 CDH 밴드가 확인되었는데 이는 GDH가 소량의 사이클로헥사놀을 사이클로헥사놀로 산화할 수 있기 때문인 것으로 추측된다.

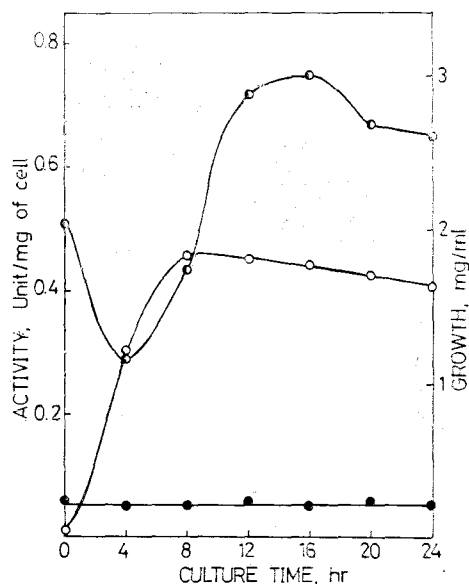
이상의 결과에서 미루어 보아 *A. calcoaceticus* C10의 GDH와 CDH는 서로 다른 것으로서 사이클로헥사놀을 산화하는 때는 비특이적인 aldose dehydrogenase에 의한 것이 아니며 NAD<sup>+</sup>를 조효소

로 하는 별개의 유도효소인 CDH가 작용하지만 GDH 역시 glucopyranose와 사이클로헥사놀의 공간구조의 유사성 때문에 소량의 사이클로헥사놀을 산화할 수 있는 것으로 생각된다(표 2,3, 그림 1).

## 2. 사이클로헥사놀에 의한 CDH의 유도

LB 배지에서 균을 배양하면서 경시적으로 생육도, GDH 및 CDH 활성을 조사한 결과는 그림 2와 같다. 균의 생육은 배양 8시간까지 왕성하였으나 그 이후에는 일정하였다. GDH는 초기대수증식기에 오히려 감소하는 현상을 보였고 4시간 후부터 증가하여 12시간 이후는 거의 비슷한 수준을 나타내었으나 CDH는 거의 생산이 되지 않았다. 배양 초기에 GDH 활성이 감소하여 4시간 후부터 증가하는 현상은 증배양액의 균체가 가지고 있던 GDH가 새로운 배지에 적응하는 과정에서 다소 파괴된 후 새로운 효소가 합성되는 기간중에 나타나는 현상으로 생각된다.

CL 배지에서의 균의 생육은 배양 12시간까지 왕성하였으나 그 후는 거의 일정한 값을 나타내었고 GDH는 8시간까지 감소하였으나 그 후는 일정하였다. CL 배지와 LB 배지에서 GDH의 생산수



**Fig. 2.** Changes of GDH and CDH activities in *A. calcoaceticus* C10 in LB medium. ●—●, CDH activity; ○—○, GDH activity; ○—○, Growth

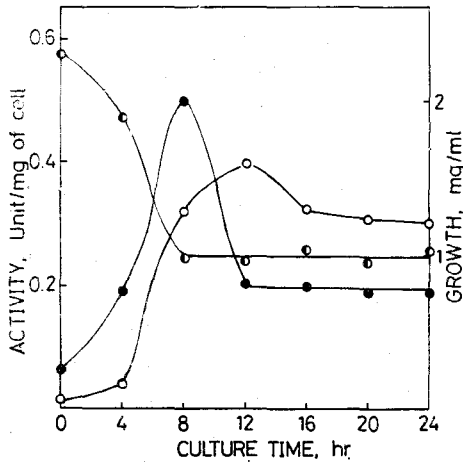


Fig. 3. Changes of GDH and CDH activities in *A. calcoaceticus* C10 in CL medium. ●—●, CDH activity; ○—○, Growth

준을 보면 LB 배지가 CL 배지보다 높다(그림 2, 3, 표 3). 그림 3의 배양초기에 GDH가 감소하는 현상은 종배양용 배지(LB 배지)에서 생산된 GDH 수준이 점차 감소하여 배양 8시간에 이르러서 CL 배지의 GDH 생산수준을 유지하기 때문에 나타나는 것으로 생각된다. CDH의 활성은 초기 대수증식기에 급작스런 증가를 보였으나 후기대수증식기에는 오히려 감소하여 생육도가 최고인 12시간 이후부터는 일정하였다(그림 3). 초기대수증식기에는 분해할 사이클로헥사놀이 많지만 후기대수증식기 이후에는 배지내에 사이클로헥사놀의 농도가 현저히 떨어진다.<sup>8)</sup> 그러므로 초기대수증식기에 CDH의 생산이 급격히 증가하여 후기대수증식기에 최고에 달하고 그 이후에는 점차 감소하게 된다. 후기대수증식기 이후부터 CDH 활성이 급격히 감소하는 현상은 세포내에 사이클로헥사놀 대사산물의 축적으로 CDH 생산이 억제된 상태에서 세포분열에 의해 이미 합성된 효소가 각 세포에 희석되기 때문인 것으로 추측된다(메이타 미제시). 정지기에 도달한 후부터 일정 수준의 CDH를 유지하는 것은 CDH 생산이 거의 중지된 상태에서 세포량의 증가가 없기 때문에 나타나는 현상으로 추측된다.

LB 배지에서 4시간 균을 배양한 후 사이클로헥사놀을 0.2% 되게 첨가하여 경시적으로 균의 생육 및 CDH의 활성을 조사한 결과 사이클로헥사놀을 첨가한 경우에 첨가하지 않은 것보다 균의 생

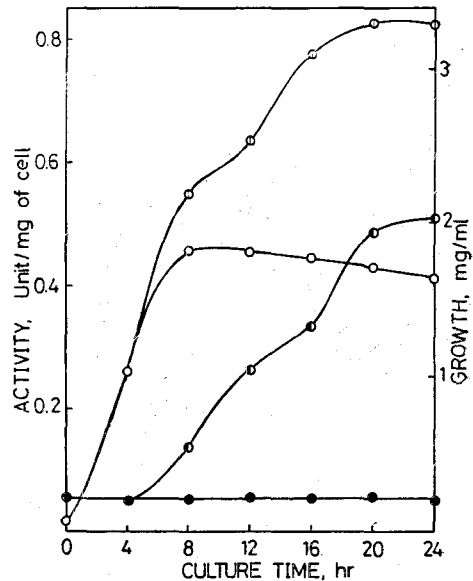


Fig. 4. Induction of CDH in *A. calcoaceticus* C10 in LB medium by the addition of 0.2% cyclohexanol after incubation for 4 hr. The arrows represent the addition of cyclohexanol. ●—●, CDH activity after the addition of cyclohexanol; ○—○, Growth after the addition of cyclohexanol; ●—●, CDH activity in LB; ○—○, Growth in LB

육은 약 2배 증가하였으며 CDH 활성 역시 생육에 따라 점차 증가하여 배양 24시간 후에는 약 8배의 활성을 나타내었다. 그래서 CDH는 사이클로헥사놀에 의해 유도되는 유도효소일 것으로 생각되었다. 이는 Donoghue와 Trudgill<sup>5)</sup>에 의해 보고된 *Acinetobacter* NCIB9871의 경우 L-glutamate 배지에서 자란 것보다 사이클로헥사놀 배지에서 자란 것이 약 7배의 CDH 활성을 나타낸 것과 비슷한 결과를 나타내었다(그림 4).

### 3. CDH의 유도물질

*A. calcoaceticus* C10이 생산하는 CDH의 유도물질을 조사하기 위해 CL base (CL 배지에서 탄소원인 사이클로헥사놀을 제외한 것)와 LB 배지에 사이클로헥사놀의 대사산물 및 유사물질을 0.2% 되게 첨가한 배지에서 균을 24시간 배양한 후 생육도와 CDH 활성을 조사한 결과는 표 4와 같

**Table 4.** CDH activities of *A. calcoaceticus* C10 grown in the CL base and LB medium added 0.2% carbon sources.

Carbon source	CL base*		LB	
	Growth (mg/ml)	CDH (Unit/mg)**	Growth (mg/ml)	CDH (Unit/mg)**
None	0.242	0.027	3.114	0.053
Cyclohexanol	1.171	0.212	4.566	0.249
Cyclohexanone	2.090	0.135	4.816	0.238
$\epsilon$ -Caprolactone	2.162	0.041	4.627	0.059
Adipate	0.911	0.027	3.872	0.041
Cyclohexan-1,2-diol***	1.820	0.195	4.948	0.244
Cyclohexene oxide	0.503	0.153	3.493	0.127

\* CL medium without cyclohexanol; \*\*Unit/mg of cell; \*\*\* *trans, cis* mixture

다. CL base에 adipate 또는 cyclohexene oxide를 첨가한 배지에서는 CL 배지에서보다 균의 생육이 감소하였으나 사이클로헥사논,  $\epsilon$ -caprolactone 또는 cyclohexan-1,2-diol을 첨가한 CL base에서는 균의 생육이 증가하였다. LB 배지에 이와 같은 탄소원을 첨가한 경우 균의 생육은 모두 LB 배지에서보다 더욱 증가하였다. CL base와 LB 배지에서 모두 CDH는 사이클로헥사놀, 사이클로헥사논, cyclohexan-1,2-diol 및 cyclohexene oxide에 의해 유도되었으며 그중에서 사이클로헥사놀의 유도효과가 가장 높았다. 그러나  $\epsilon$ -caprolactone 및 adipate에 의해서는 CDH가 유도되지 않았다. Hydrocarbon 대사에 있어서 가장 잘 알려진 조절 기구인 ketoadipate 대사경로를 거쳐서 *p*-hydroxybenzoate와 benzoic acid를 분해하는 미생물로는 *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alkaligenes entrophus* 등이 있으며 이 대사경로의 효소유도에 대하여 많은 연구보고가 있다. *A. calcoaceticus*의 경우 *p*-hydroxybenzoate에서 자란 것은 대사경로의 모든 효소가 protocatechuate에 의해 유도되나 benzoic acid에서 자란 것은 *cis, cis*-muconate에 의해 catechol에서 분해되는 경로의 모든 효소가 유도된다고 한다.<sup>16)</sup> 본 실험에서 사용된 *A. calcoaceticus* C10의 CDH가 대사중간물인 사이클로헥사논 및 이의 전구물질인 cyclohexene oxide에 의해서도 유도되므로 사이클로헥사놀과 cyclohexene oxide 자체에 의해서 유도되는지 아니면 사이클로헥사놀의 산화 및 cyclohexene oxide의 환원으로 생겨난 사이클로헥사논에 의해 유도되는지와 사이클로헥사놀 또는 사

이클로헥사논에 의해 사이클로헥사놀 대사경로의 모든 효소가 유도되는지에 관하여는 좀더 연구해야 할 과제이다.

### 요 약

CL 배지에서 자란 *A. calcoaceticus* C10은 glucose dehydrogenase(GDH)와 cyclohexanol dehydrogenase(CDH)를 모두 생산하였다. *A. calcoaceticus* C10에 의한 사이클로헥사놀의 산화가 비특이적인 GDH에 의한 것인지를 알아보기 위하여 GDH와 CDH의 차이를 조사한 결과 GDH는 NAD<sup>+</sup>와 NADP<sup>+</sup>를 모두 조효소로 이용하였으나 CDH는 NAD<sup>+</sup>만을 조효소로 이용하였으며 NADP<sup>+</sup>를 이용하지 못하였다. GDH는 LB 배지와 0.2%의 포도당 또는 사이클로헥사놀을 첨가한 LB 배지 및 CL 배지에서 모두 생산되었으나 CDH는 사이클로헥사놀을 첨가한 배지에서만 생산되었으며 7.5% polyacrylamide 겔 전기영동 결과 GDH와 CDH는 서로 다른 활성 밴드를 나타내었다. 이로써 GDH와 CDH는 서로 다른 것이며 사이클로헥사놀의 산화는 비특이적인 GDH에 의한 것이 아님을 확인하였다. LB 배지에서 *A. calcoaceticus* C10을 4시간 배양 후 사이클로헥사놀을 첨가할 경우 배양 24시간에 LB 배지에서보다 약 8배의 CDH 활성을 나타내었으며 생육도는 약 2배의 증가현상을 나타내었다. CDH는 사이클로헥사놀, 사이클로헥사논, cyclohexan-1,2-diol 및 cyclohexene oxide에 의해 유도되었으나  $\epsilon$ -caprolactone과 adipate에 의해서는 유도되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Browning, E.: Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents, p. 385, Elsevier, N.Y. (1965).
2. Yugari, Y.: Biken J., 4 : 197(1961).
3. Elliott, T.H., R.C.C.Tao and R.T. Williams: Biochem. J., 95 : 59(1965).
4. Norris, D.B. and P.W. Trudgill: Biochem. J., 121 : 363(1971).
5. Donoghue, N.A. and P.W. Trudgill: Eur. J. Biochem., 60 : 1(1975).
6. 田中秀和, 小幡齊, 徳山泰, 上野照雄, 吉迫文紀, 西村篤夫: 醱酵工學, 55 : 62(1977).
7. 이인구: 효성여자대학교 연구논문집, 23 : 11 97(1981).
8. 김경애, 박종성, 이인구: 산업미생물학회지, 13(1) : 71(1985).
9. Stirling. L.A.. R.J. Watkinson and I. J. Higgins: J. Gen. Microbiol., 99 : 119(1977).
10. Krieg, N.R. and J.G. Holt: Bergey's manual of systematic bacteriology, p. 305, Williams & Wilkins, Baltimore/London(1984).
11. Rodriguez, R.L. and R.C. Trait: Recombinant DNA Techniques; An Introduction, p. 126, Addison-Wesley Publishing Co., Massachusetts(1983).
12. Bradford, M.M.: Anal. Biochem., 72 : 248 (1976).
13. Davis, B.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 121 : 404(1964).
14. Williams, D.E. and R.A. Reisfeld: Ann. N.Y. Acad. Sci., 121 : 373(1964).
15. Adachi, O., K. Matsushita, E. Shinagawa and M. Ameyama: Agric. Biol. Chem., 44 : 301(1980).
16. Dolle, H.W.: Bacterial Metabolism, 2nd Ed., p. 521, Academic Press, London (1975).