

Hansenula sp. MS-364가 생산하는 Alcohol Oxidase의 정제 및 성질

김병호 · 김형만 · 권태중*
건국대학교 미생물공학과

Purification and Properties of Alcohol Oxidase Produced by *Hansenula* sp. MS-364

Byoung-Ho Kim, Hyung-Man Kim and Tea-Jong Kwon*

Department of Microbial Engineering, College of Engineering
KonKuk University, Seoul 133-701, Korea

Abstract — Methanol assimilating yeast, *Hansenula* sp. MS-364 that has high productivity with methanol as carbon and energy source has been preserved at dept. of Microbiological engineering. Purification and properties of alcohol oxidase (E.C.1.1.3.13: oxygen oxidoreductase) were investigated in the methanol assimilating yeast, *Hansenula* sp. MS-364. Alcohol oxidase is related to the catalytic reaction that degrades alcohol to aldehyde and peroxide. The methanol oxidizing enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-50 chromatography and gel filtration on Sepharose 6B from cell-free extract. The purified enzyme preparation gave a single band in the sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The molecular weight of the enzyme was calculated to be about 576,000 and molecular weight of subunit was also calculated to be 72,000. The optimal pH and temperature of the enzyme reaction were pH 7.5 and 37°C, respectively. The enzyme was unstable in acidic pH and higher temperature. The enzyme was not specific for methanol and also oxidized lower primary alcohols. The Km value for methanol was 2.5 mM and that for ethanol was 1.66 mM. The enzyme was heavily inhibited by metal ions such as Hg²⁺, Ag²⁺, Cu²⁺. The high concentration of EDTA and sulfhydryl reagents strongly inhibited the enzyme activity. The component of coenzyme was determined to flavin adenine dinucleotide.

Alcohol oxidase는 alcohol을 분해하여 aldehyde와 과산화수소를 생성하는 반응을 촉매하는 효소로서 1965년 Janssen 등에 의해 methanol을 탄소원 또는 에너지원으로 이용하는 Basidiomycetes 균체내에서 처음 발견, 분리되었다. 그 후 메탄올 자화효모는 1969년 Ogata(1)에 의해 최초로 분리 보고되었고, 1970년대에 들어서 메탄올을 균체 생산의 탄소원으로서 이용하는 것이 주목되기 시작하였다.

그 결과 n-paraffin과 메탄올 등으로부터 single cell protein(SCP)을 생산하기 위한 공업적 생산공정을 완성하기에 이르렀다. 메탄올은 메탄이나 메탄관련 천연 물질로부터 직접적으로 생산되며, 높은 순도(> 99.8%)와 대량생산이 가능하다. 메탄올은 메탄과 다른

C₁ 화합물, n-paraffin 등과는 달리 물과의 균일한 혼합이 용이하다. 또한 생화학적인 면에서도 메탄올은 고도로 환원된 메탄보다 산화환원 전위가 높아서 세포대사와 생합성의 중요성분을 효소반응에 의해 쉽게 전환할 수 있는 장점을 가지고 있다. 메탄올은 다른 feedstock 보다 저렴한 가격과 위의 장점 때문에 SCP 생산을 위한 원료 뿐만 아니라 각종 대사 산물을 생산하기 위한 탄소원으로서도 유용하게 이용되고 있다. 반면 glucose나 다른 carbohydrate와 비교해서 산소 요구성과 발효열이 높은 단점을 지니고 있다(2-6). 메탄올 자화성 효모가 메탄올에서 성장시 peroxisome이라는 특수한 유도기관이 생기며 메탄올 분해시 가장 먼저 작용하는 효소는 alcohol oxidase와 catalase이다. Alcohol oxidase의 이용면으로는 산소의 소모량을 측정함으로써 alcohol에 대한 정량적 분석에 이용하며, 효소반응의 산물인 formaldehyde를 이용

Key words: *Hansenula* sp. alcohol oxidase
*Corresponding author

하여 병원의 기재와 모포 등의 소독에 이용하며, 향료 화합물의 생산과 ethanol의 회수 등에도 이용되고 식품, 양조, 발효 공정시 알코올의 측정에 이용된다.

따라서 본 연구는 이와 같이 다양한 이용성을 가진 alcohol oxidase를 생산하는 메탄올 자화효모로부터 생산된 효소를 정제하여 그 성질을 조사하였기에 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험실에서 분리, 보관하고있는 균주 가운데 methanol 자화성이 높은 *Hansenula* sp.(MS-364) 균주를 사용하였다.

균의 배양 및 효소액의 제조

2.5l 용 Jar fermentor에 3% methanol, 0.8% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 조성으로 만든 배지(pH 6.0) 1.5l를 넣어 살균 후 전배양액을 2%(v/v)되게 접종한 후 500 rpm, 30°C에서 24 hr 배양 후 원심분리하여 얻은 균체를 초음파 파쇄기(200 w, 15 min, 3회)를 이용하여 파쇄 후 여액에 $(NH_4)_2SO_4$ 40~80% 분별침전하여 소량의 인산 완충용액에 용해시킨 후 24 hr 투석하여 탈염시켰다.

효소활성 측정

Formaldehyde 측정 Alcohol oxidase의 효소활성은 메탄올이 분해되어 생성되는 formaldehyde를 chromotrophic acid와 착염을 형성시켜 측정하였다(7). 즉 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 methanol을 10 mM 되게 혼합하여 혼합액 1.4 ml과 효소액 0.1 ml을 넣어 효소작용 시켰다. 이 때 효소 단위는 1분당 생성된 1 μ mol의 formaldehyde를 생산하는 효소량을 1 unit로 하였다.

H₂O₂ 정량 Alcohol oxidase가 methanol을 분해하여 생성된 과산화수소를 peroxidase를 첨가하여 분해시켜 생성된 산소에 의한 2-2' azino-di(3-ethyl benzthiazolene 6-sulfonic acid(ABTS)의 산화 정도를 spectrophotometer로 측정하는 방법(8)에 따라 그 활성을 측정하였으며, 이 때 표준 곡선은 과산화수소 표준용액으로 흡광도를 측정하여 나타내었으며, 효소의 단위는 1분 동안 1 μ mol의 과산화수소를 생성하는 효소의 양으로 하였다. 이 방법은 기질이 methanol 이외 다른 alcohol을 기질로하였을 때 사용하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Bradford 방법(9)으로 측정하였고 표준으로는 bovine serum albumin(Sigma)을 사용하였다. 효소 정제과정에서 단백질 농도는 Bradford 방법과 Hitachi 200-20 spectrophotometer를 사용하여 280 nm에서 측정하였다.

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

탈염한 효소액을 0.05 M-phosphate buffer(pH 7.5)로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(2.3×28 cm)에 주입하고 NaCl을 함유한 0.05 M-phosphate buffer(pH 7.5)로 stepwise 법으로 시간당 50 ml의 유속으로 elution 시키면서 3 ml 씩 분획하였다.

Sepharose 6B column chromatography

효소활성을 나타내는 분획을 모아 polyethylene glycol(M.W. 20,000)로 농축시키고 Sepharose 6B column(1.2×90 cm)에 주입하여 동일 buffer로 시간당 5 ml의 유속으로 용출시켰다.

Subunit 추정

Laemmli(10)의 방법에 따라 8.5%의 acrylamide gel (7×8 cm)을 사용하여, 10% SDS 존재하에서 pH 8.8의 Tris buffer를 사용하여 40 mA에서 약 2시간 전기영동하였으며, 전기영동 후 0.1% Brilliant Blue G-250에 염색한 후 ethanol : acetic acid : water(3 : 1 : 6)로 탈색하였다. 전개 후 상대이동거리에 따라 표준 곡선을 이용하여 subunit 분자량을 측정하였다. 이 때 표준 단백질로는 Sigma Co.의 SDS-6H를 사용하였다.

분자량 결정

Alcohol oxidase의 분자량은 Andrew(11, 12) 등의 방법에 따라 Sepharose 6B를 사용하여 gel filtration 법으로 측정하였다. 표준 단백질로는 Tyroglobulin (M.W. 669,000), Apoferritin(M.W. 443,000), β -Amylase(M.W. 200,000), Alcohol dehydrogenase(M.W. 150,000)을 사용하였다.

보호소의 성분

메탄올 자화성 미생물이 생산하는 alcohol oxidase는 대부분 보호소로 flavin 색소를 함유하고 있다. 본 효소의 보호소 성분을 조사하기 위하여 정제된 효소를 100°C에서 열변성시킨 후 5%가 되도록 trichloroacetic acid를 혼합하여 단백질을 침전시키고 그 상등액을 시료로하여 흡수 spectrum과 acetone : n-butanol : acetic acid : water(2 : 5 : 1 : 3) 및 n-buta-

nol : methanol : 0.5% disodium phosphate(4 : 1 : 2)를 전개용제로하여 25°C에서 상용법으로 paper chromatography 법으로 확인하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography 배양하여 얻은 균체를 초음파 파쇄기로 파쇄 후 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 염석, 탈염한 후 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography 한 결과는 Fig. 1과 같이, NaCl 0.3 M에서 효소가 용출되었으며 다른 peak에서는 효소의 활성이 없었으며 회수율은 약 42.4%였다.

Sepharose 6B column chromatography Fig. 1에서의 효소활성 부위를 모아 농축하여 Sepharose 6B column chromatography를 한 결과는 Fig. 2와

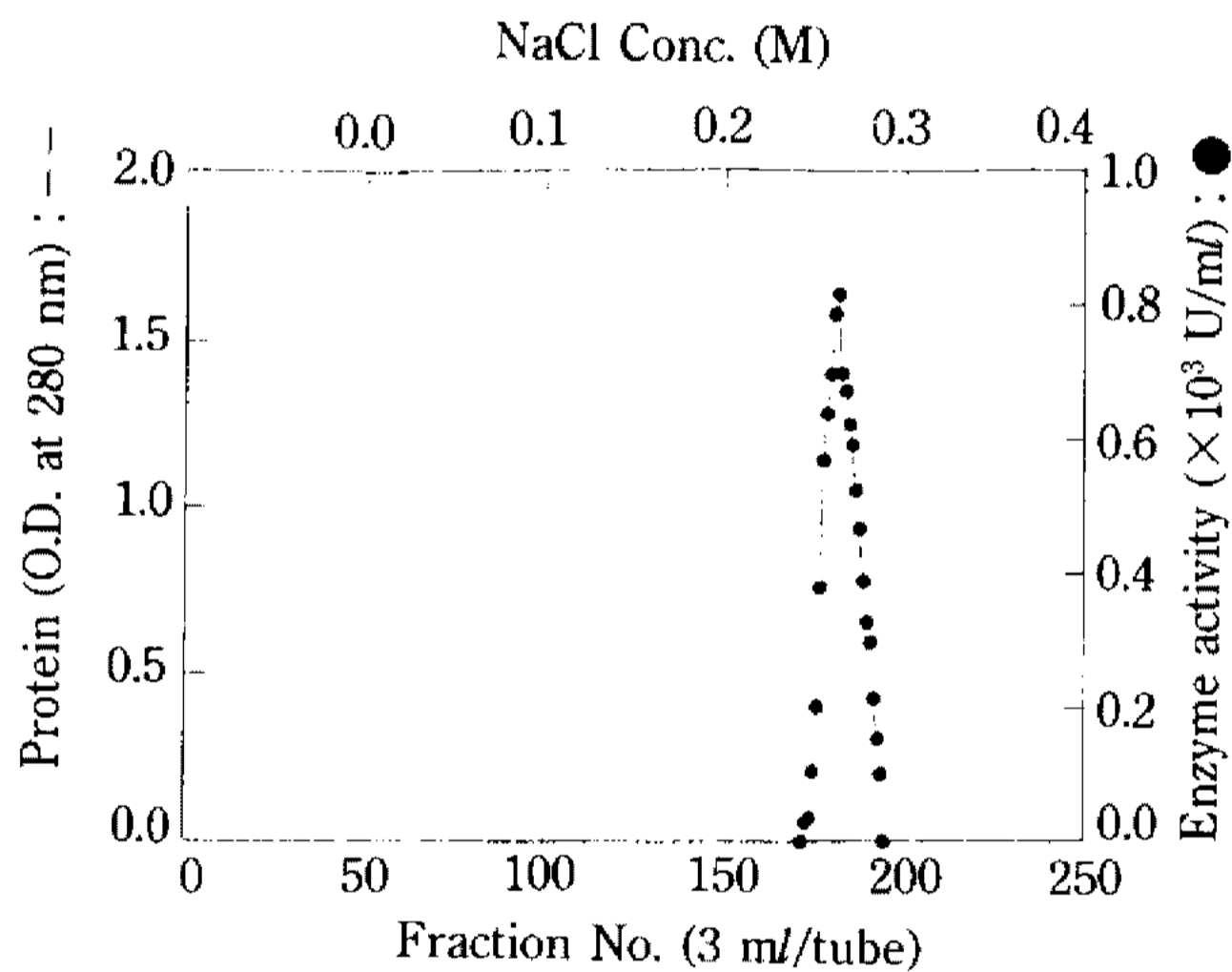


Fig. 1. Column chromatography of alcohol oxidase on DEAE-Sephadex A-50.

The dialyzed enzyme (237.5 mg) solution was applied to a column (2.3×28 cm) equilibrated with 0.05 M-phosphate buffer (pH 7.5). Three milliliter fractions were collected at flow rate of fifty milliliter per hour. ●-●: enzyme activity, ----: amount of protein

같이 단백질 peak와 활성도 peak가 일치하였으므로 정제되었을 것으로 사료된다. 한편 정제과정중의 효소정제도를 요약하면 Table 1과 같았고 약 3.8배 정제되었으며 그 수율은 약 32.2%이었다. 이와 같은 결과는 Couderc 등(15)의 55%, Sahm 등(17)의 47.6%보다 낮았으나 Shin 등(14)의 3.8%보다는 효소의 최종수율이 높았다.

효소의 단일성과 분자량 및 Subunit

정제효소의 단일성과 분자량을 조사하기 위하여 Sepharose 6B를 이용하여 gel filtration 한 결과는 Fig. 3과 같이 단일성을 보였으며 분자량은 약 576,000으로 추정되었으며 SDS-PAGE를 이용하여 표준단백질의 영동거리와 비교, 환산한 결과는 Fig. 4와 같이

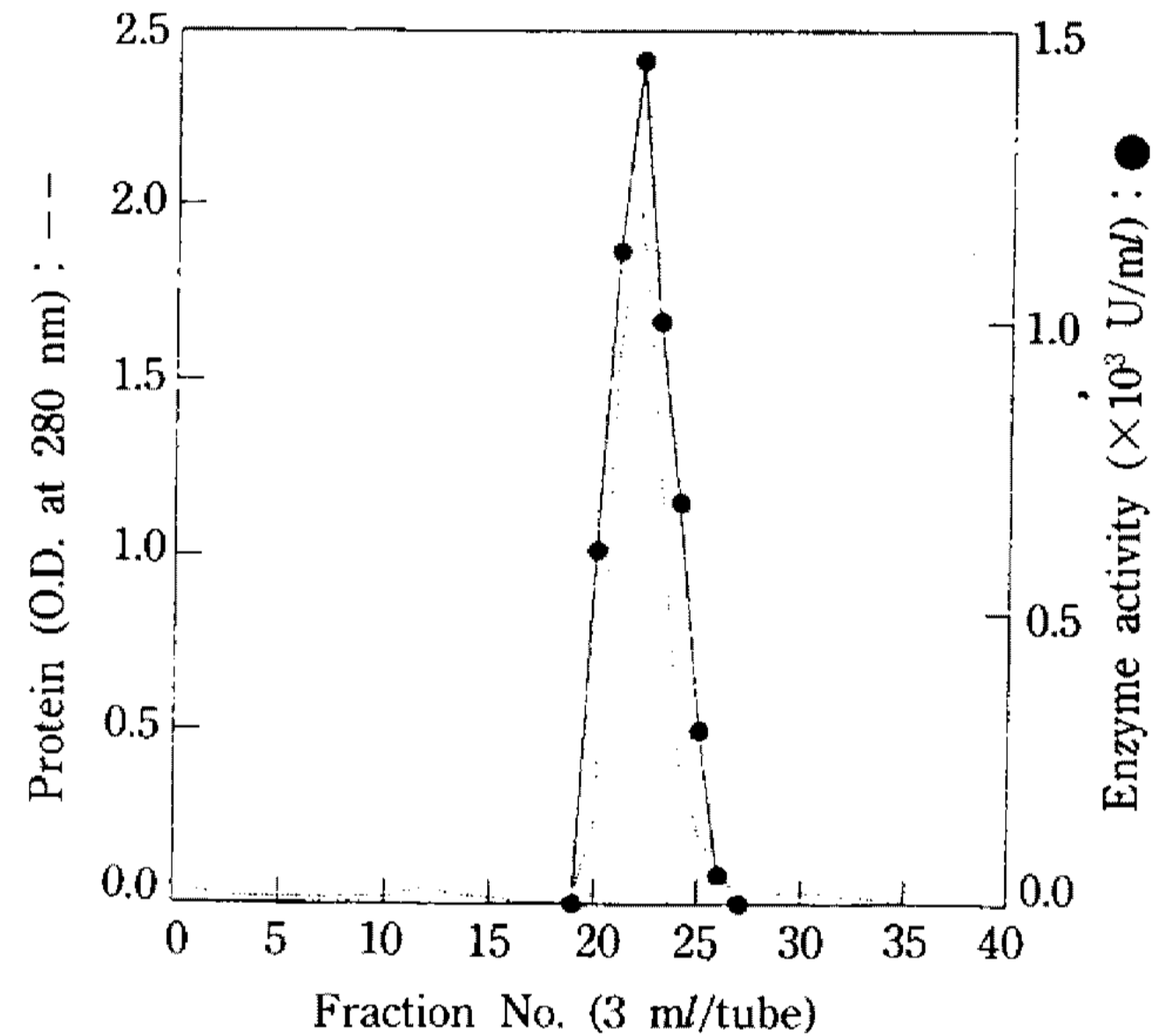


Fig. 2. Gel filtration of alcohol oxidase on Sepharose 6B.

The dialyzed enzyme (92.7 mg) solution (obtained after chromatography on DEAE-Sephadex A-50) was applied to a column (1.2×90 cm) equilibrated with 0.05 M-phosphate buffer, pH 7.5. The fractions of three milliliter were collected at flow rate of five milliliter per hour. ●-●: enzyme activity, ----: amount of protein

Table 1. Purification steps of alcohol oxidase from *Hansenula* sp. MS-364

step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (u/mg)	Yield (%)
Cell free extract	550.0	89,600	163	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40~80%)	237.5	51,670	218	57.7
DEAE-Sephadex A-50 column chromatography	92.7	38,000	410	42.4
Sepharose 6B column chromatography	48.0	28,900	625	32.2

Enzyme activities were determined as described in MATERIAL AND METHODS. Protein was assayed by spectrophotometry.

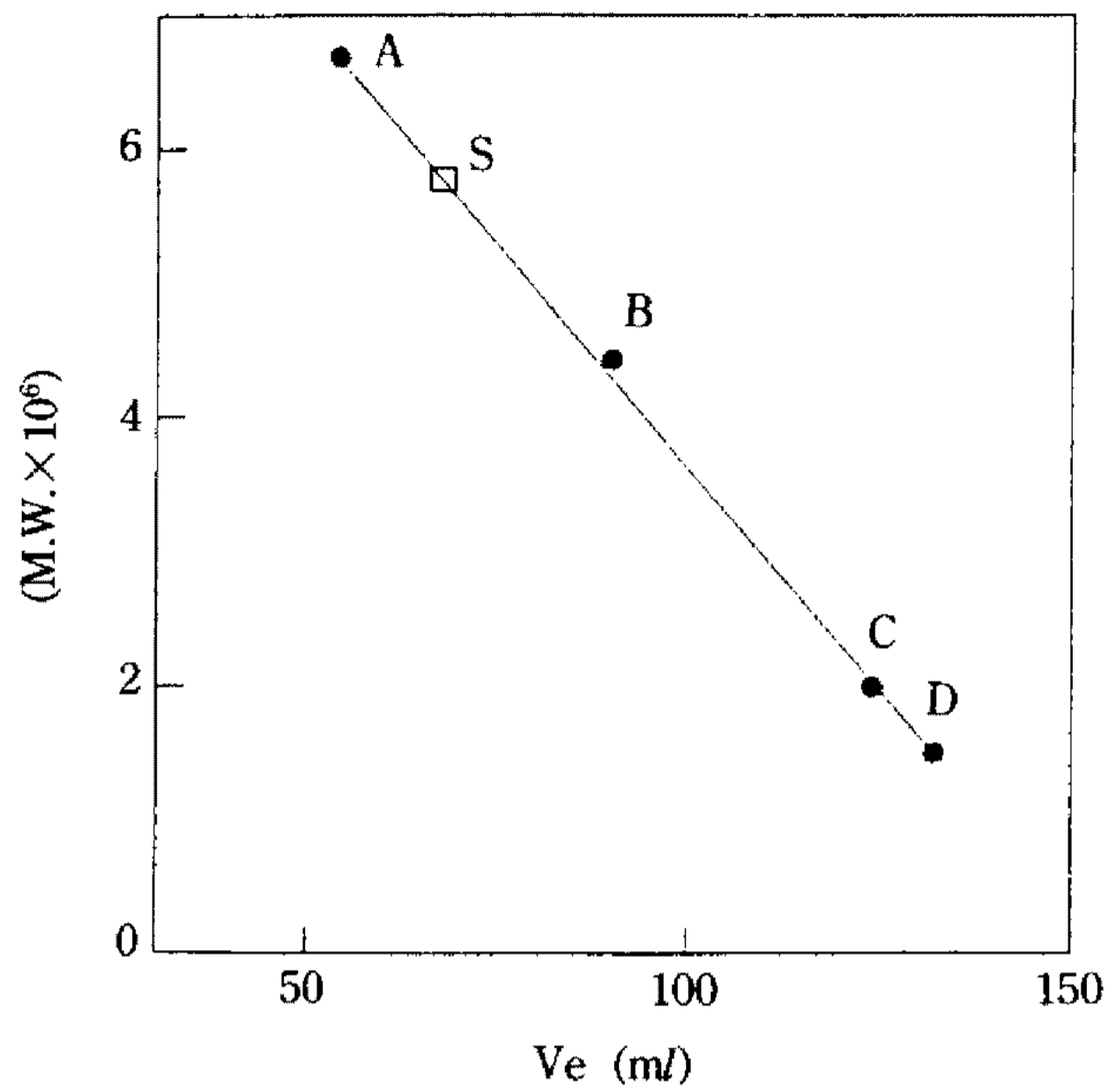


Fig. 3. Determination of alcohol oxidase molecular weight by gel filtration.

A column (1.2×90 cm) of Sepharose 6B equilibrated with 0.05 M-phosphate buffer, pH 7.5, was eluted at a flow rate of five milliliter per hour. The fraction of three milliliter were collected. Each standard protein was applied as a solution of 1 mg in 0.5 ml of buffer. V_e is the elution volume.

A: Thyroglobulin (669,000), B: Apofferitin (443,000), C: β -amylase (200,000), D: Alcohol dehydrogenase (150,000)

subunit 당 분자량이 약 72,000 dalton으로 추정되었다. 이는 Tani 등(13)의 72,000과 일치하였으며, Shin 등(14)의 65,000보다 높고, Couderc 등(15)의 80,000과 Kato 등(16)의 82,000과 Sahm 등(17)의 79,000보다는 낮았다. 분자량과 비교하여 subunit의 수를 환산하여 보면 본 효소는 8개의 subunit로 구성되었다고 판단된다. 이와 같은 결과로 Kato 등(16)은 2개의 tetragons으로 이루어진 8개의 subunit를 갖고 있다는 보고에 이어, 다른 여러 연구보고(13-18)와 유사하였다.

정제 효소의 성질

pH의 영향 pH의 영향을 조사하기 위해 citrate/sodium citrate buffer(pH 3~6), phosphate buffer (pH 6~8), borate-NaOH buffer(pH 8~10)을 사용하여 37°C 에서 각 pH 별로 15분간 반응시켜 활성도를 측정된 결과 효소의 반응 최적 pH는 Fig. 5와 같이 약 7.5로 중성 부근에서 최적활성을 보였다. 또한, pH의 안정성을 조사하기 위해 37°C 에서 각기 다른 pH buffer에서 반응시킨 후 잔존활성을 측정된 결과 pH 7~8 사이의 중성부근에서 안정성이 높았다. 이는 Shin 등(14)의 보고와 일치하며, 중성부근에서 안정성이 높다는 많은 연구자들의 보고(13-18)와 유사하였다.

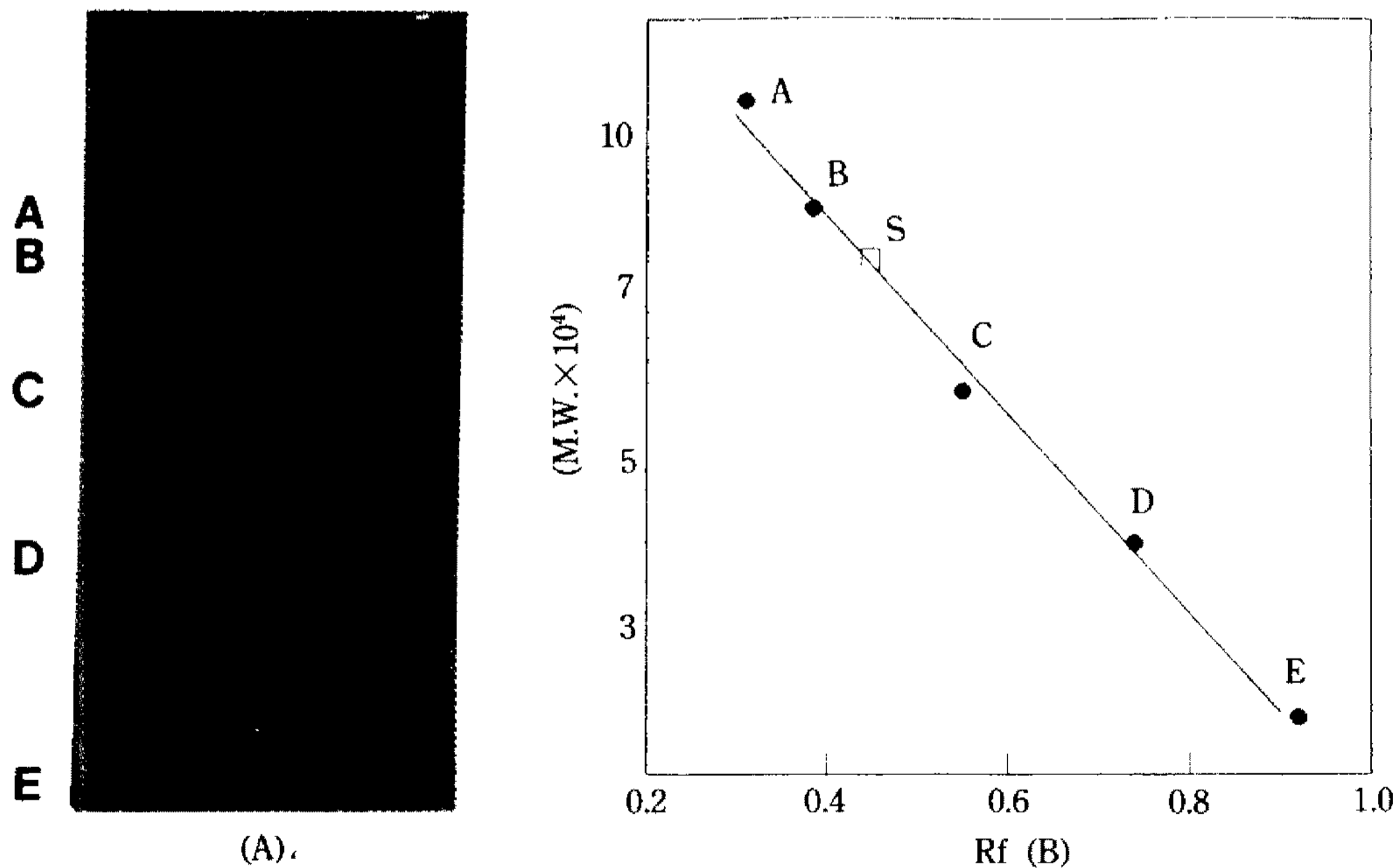


Fig. 4. SDS-PAGE of purified enzyme (A) and relationship between Rf value and M.W. (B).

The electrophoresis was performed in 8.5% polyacrylamide gel containing 10% sodium dodecylsulfate solution at pH 8.8 with a current of 40 mA per plate. About 20 μ g of protein were applied. Gel was stained with Brilliant Blue G 250.

A: β -galactosidase (116,000), B: Phosphorylase (97,400), C: Albumin, bovine (66,000), D: Albumin, egg (45,000), E: Carbonic anhydrase (29,000)

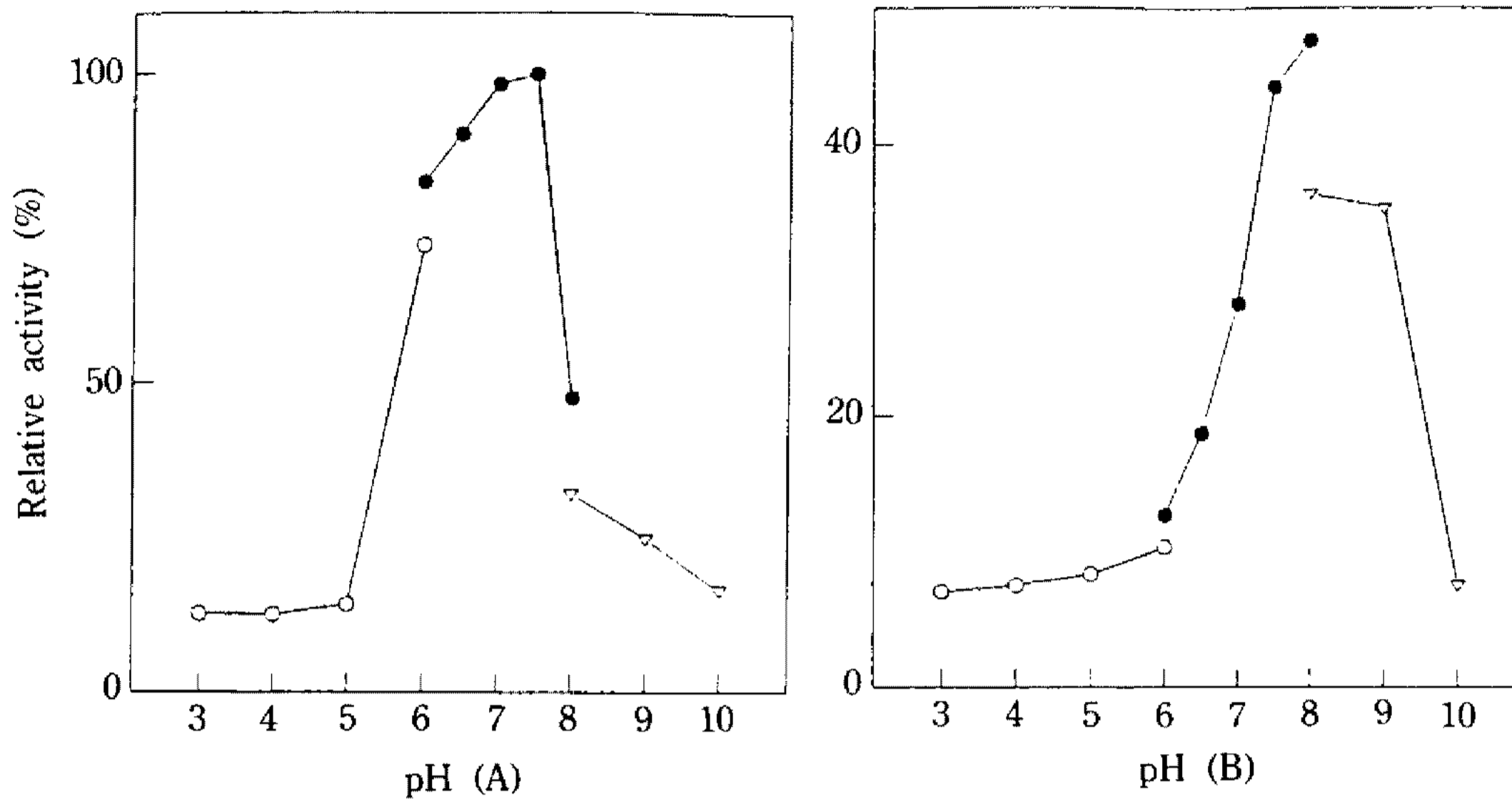


Fig. 5. Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of alcohol oxidase.

(A) The reaction was carried out at 37°C for 15 min. Buffer was used as Citrate buffer (pH 3 to 6), Phosphate buffer (pH 6 to 8) and Borate buffer (pH 8 to 10).

(B) The enzyme was incubated in various buffer (pH 3.0 to 10.0) at 25°C for 60 min. After adjustment of pH to 7.5, the enzyme activity was assayed by the above method.

○: Citrate buffer (pH 3~6), ●: Phosphate buffer (pH 6~8), ▽: Borate buffer (pH 8~10)

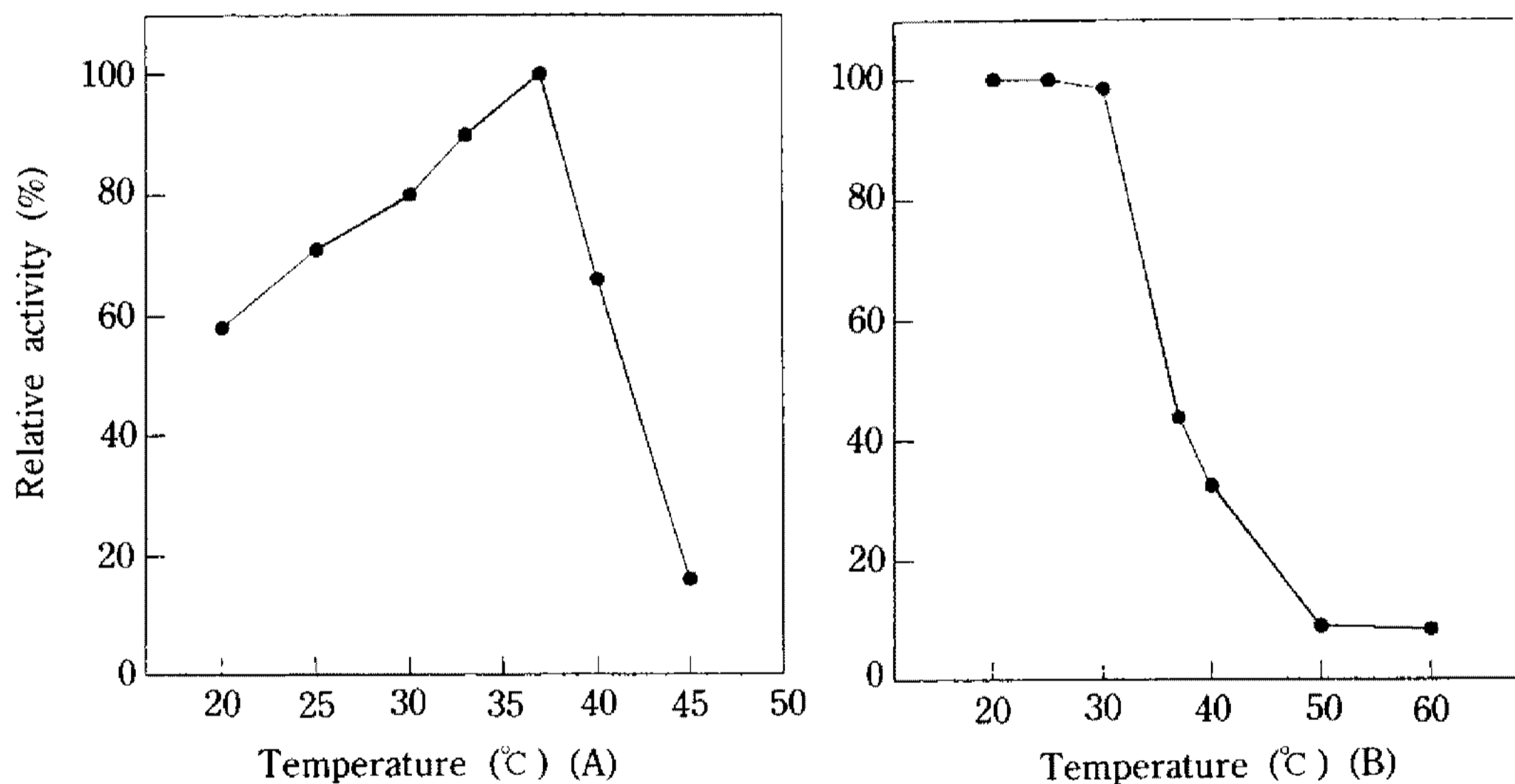


Fig. 6. Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of alcohol oxidase.

(A) The reaction was carried out at various temperatures for 15 min in phosphate buffer (pH 7.5).

(B) The enzyme solution in phosphate buffer (pH 7.5) was incubated at various temperatures for 60 min. The residual activities after incubation were assayed under the standard method 1

온도의 영향 효소에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 20~40°C 까지 변화시켜 활성을 조사하였다. Fig. 6과 같이 37°C 에서 최적활성을 보였고, 효소를 각 온도별에서 10분간 열처리한 후 잔존활성을 실험한 결과 37°C 부근에서 50%의 잔존활성을 보였다. 이는 Kato 등(16)이 보고한 *Kloeckera* sp.의 35°C 보다는 높고 *Hansenula* sp.의 45°C 보다는 낮은 결과로 여러 연구자들이 보고(13-18)한 것과 같이 본 효소는 비교

적 열에 대한 안정성이 낮은 것으로 사료된다.

금속이온의 영향 금속이온의 영향을 조사하기 위해 금속이온을 최종농도가 1 mM과 5 mM 되게 첨가하여 실온에서 1시간 방치한 후 잔존활성을 측정한다. 결과는 Table 2와 같이 Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} 등에 의해 강력하게 저해를 받았다. 이와 같은 결과는 Shin 등(14)의 보고와, Tani 등(18)의 보고와 일치하였다.

유기 시약의 영향 효소활성에 미치는 유기시약의

Table 2. Effect of metal ions on alcohol oxidase activity

Metal ions	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	78	38
HgCl ₂	0	0
AgNO ₃	0	0
CuSO ₄	0	0
Pb(NO ₃) ₂	0	0
BaCl ₂ ·2H ₂ O	84	59
MnSO ₄ ·4-6H ₂ O	90	80
CaCl ₂ ·2H ₂ O	85	54
MgSO ₄ ·7H ₂ O	93	75
CdCl ₂ ·2H ₂ O	86	64
FeSO ₄ ·7H ₂ O	81	56
Al ₂ (SO ₄) ₃	75	10

The purified enzyme (5 µg) was used and the enzyme activity was measured under the standard assay conditions with addition of metal ion in final concentration of 1 mM and 5 mM. The reaction was initiated by addition of substrate after the enzyme preincubated with metal ion for 10 min.

Table 3. Effect of organic agents on alcohol oxidase activity

Organic agents	Relative activity (%)		
	1 mM	5 mM	1 M
None	100	100	
EDTA	99	84	60
<i>o</i> -Phenanthroline	80	73	50
Iodoacetic acid	92	60	
PCMB	10	0	
Cystein	66	20	
PMSF	97	89	
SDS	95	90	
Oxalic acid	99	93	
KMnO ₄	20	10	
KCN	88	55	
Sodium azide	60	46	
Sodium arsenate	60	56	

The reaction condition was carried out as described in Table 2. EDTA: ethylene diamintetraacetic acid, PCMB: *p*-chloromercuribenzoate, PMSF: phenylmethyl sulfonyl fluoride, SDS: sodium dodesyl sulfate.

영향을 조사하기 위해 유기시약 농도가 1 mM과 5 mM 되게 첨가하여 실온에서 1시간 방치한 후 잔존 활성을 측정된 결과는 Table 3과 같이 chelating agents인 EDTA와 phenanthroline 등에 의해 고농도에서

Table 4. Substrate specificity of alcohol oxidase

Substrates	Relative activity (%)
Methanol	100
Ethanol	108
Propanol	85
Iso-propyl alcohol	32
Allyl alcohol	67
Butanol	74
Iso-butyl alcohol	20
Iso-amyl alcohol	0
Hexanol	0
Octyl alcohol	0
Glycerol	0

The purified enzyme (5 µg) was used in this experiment. The enzyme activity was measured by Method 2 except that 10 m moles of various alcohol were used as substrate.

저해되는 현상으로 보아 본 효소에는 금속이 강하게 결합되어 있다고 추측된다. 특히 *p*-chloromercuribenzoate에 의해 강력히 저해를 받고 cysteine에 의하여 크게 저해되는 현상으로 보아 -SH기를 함유하고 있는 효소일 것으로 추정된다. 이는 Shin 등(14)과 Tani 등(18)의 결과와 일치하였다.

각종 기질에 대한 효소반응 특이성 효소의 각종 알콜에 대한 기질 특이성을 조사하기 위해 10 mM의 phosphate buffer(pH 7.5)에 각종 알콜을 첨가하여 그 특이성을 조사한 결과는 Table 4와 같이 methanol 뿐만 아니라 ethanol, propanol, butanol 등 C₁~C₄까지의 짧은 탄소사슬을 산화시키는 능력을 보였다. 이와 같은 결과는 많은 연구자들(13-18)이 보고한 alcohol oxidase의 기질에 대한 특이성 보고와 일치하였다.

반응 속도에 미치는 기질 농도의 영향 효소반응 속도에 대한 기질 농도의 영향을 조사하기 위해 기질 농도를 달리하여 분해도를 측정하여 Lineweaver-Burk plot으로 조사한 결과는 Fig. 7과 같이 methanol에 대한 Km 값은 2.5 mM이었고 ethanol에 대한 Km 값은 1.66 mM이었다. 이와 같은 결과는 Tani 등(13)의 methanol에 0.2 mM, ethanol에 1.0 mM과 Couderc 등(15)의 1.4 mM, Kato 등(16)의 0.4 mM, Shin 등(14)의 0.0192 mM보다는 높은 값을 보였다.

보효소의 성분 보효소의 성분을 조사하기 위하여 spectrophotometer를 이용하여 정제효소의 흡광도를 조사한 결과 Fig. 9와 같이 376 nm 및 450 nm에서 최대의 흡광도를 나타내므로 이는 순수한 FAD의 흡광도와 동일하므로 본 효소는 보효소의 성분이

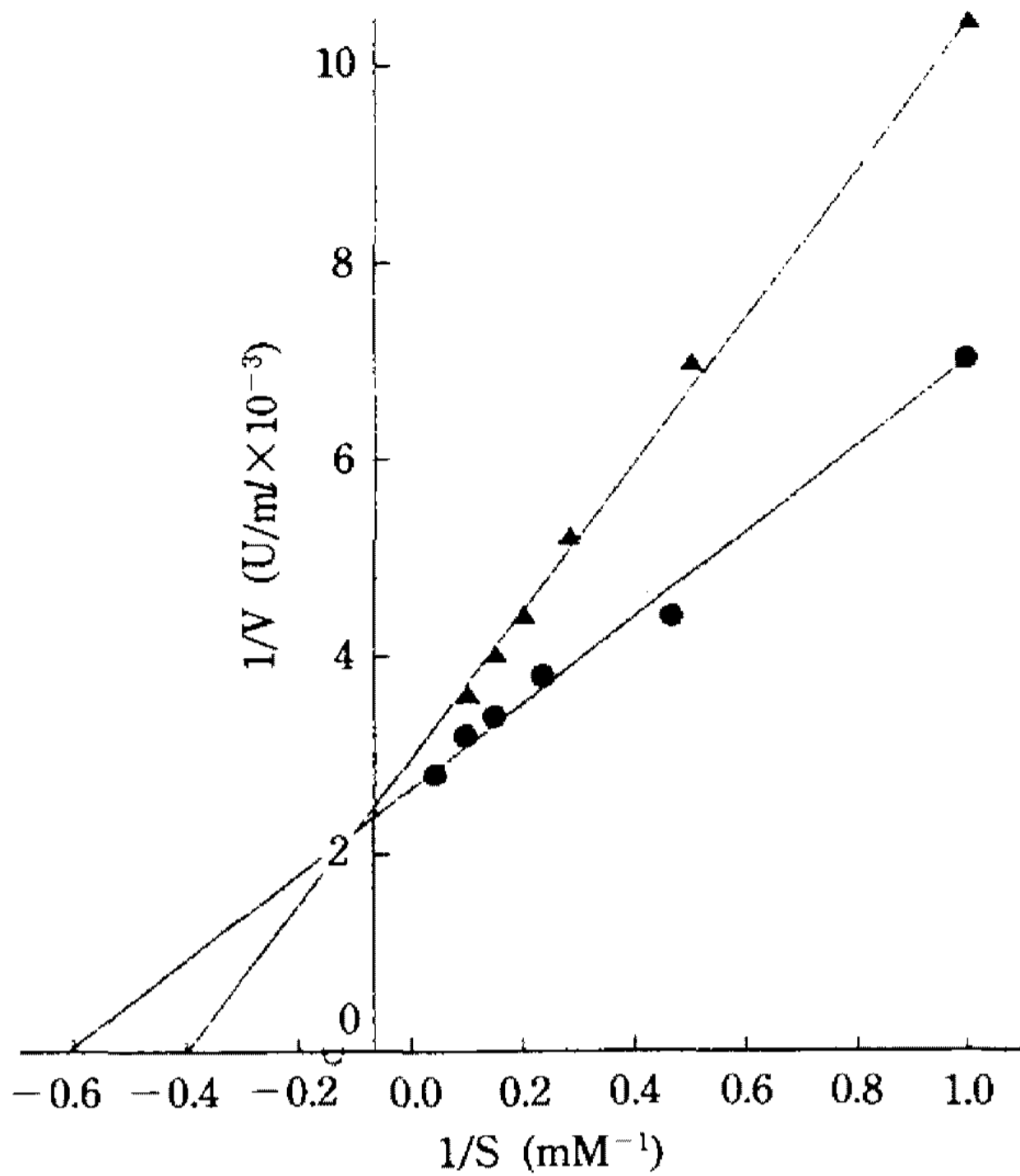


Fig. 7. Effect of substrate concentration toward methanol and ethanol on the reaction rate.

K_m value of alcohol oxidase on methanol and ethanol was calculated from Lineweaver-Burk plot. The reaction was carried out at 37°C for 15 min.

▲: Methanol, ●: Ethanol

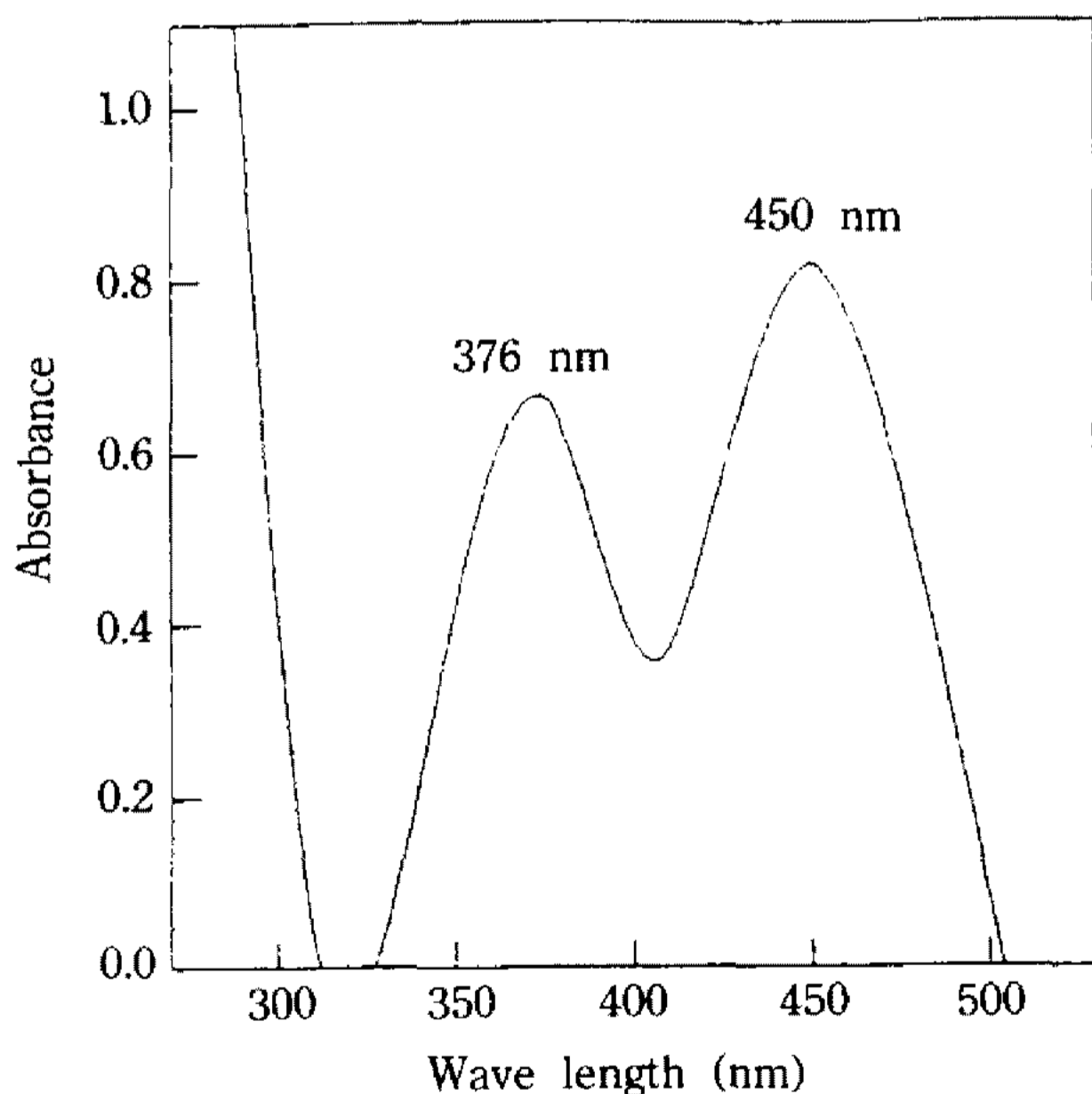


Fig. 8. Absorption spectrum of alcohol oxidase from *Hansenula* sp. (MS-364).

Purified enzyme was used at a concentration of 0.60% in 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5

FAD라고 추측된다. 이는 Couderc 등(15)이 *Pichia* sp.의 경우 370, 447 nm에서 최대 흡광도를 보인 결

Table 5. Rf value of coenzyme of the alcohol oxidase from *Hansenula* sp. MS-364

Kind of Flavin	Solvent	
	A	B
Sample	0.12	0.10
FAD	0.12	0.10
FMN	0.35	0.21
Riboflavin	0.60	0.38

The running condition was at 25°C for 20 hours on a Wattman paper No. 50 by ascending method.

Solvent system A: acetone:n-butanol:acetic acid:water (2:5:1:3), B: n-butanol:methanol:0.5%-sodium phosphate (4:1:2)

과와 거의 유사하다. 한편 Tani 등(13)의 370, 395, 467 nm, Kato 등(16)의 375, 395, 460 nm, Shin 등(14)의 375, 465 nm, Tani 등(18)은 373, 392, 461 nm에서 최대의 흡광도를 나타내었다.

보효소의 FAD를 확인하기 위하여 paper chromatography 한 결과는 Table 5와 같이 Rf치가 표준품의 Rf치와 일치하므로 본 효소의 성분은 FAD라고 판단된다.

요 약

Alcohol oxidase 생산력이 높은 *Hansenula* sp. MS-364로부터 얻은 조효소액을 ammonium sulfate 침전, DEAE Sephadex A-50 column chromatography, Sepharose 6B column chromatography 법에 의하여 정제하였다. 이때 수율은 32.2%이었고 3.8배의 정제도를 가진 효소단백질을 얻었다. 정제효소는 gel filtration 법에 의하여 그 분자량은 약 576,000이었으며, SDS-PAGE에 의하여 subunit 당 분자량은 약 72,000 dalton이었다.

최적온도는 37°C, pH는 7.5로 열안정성은 낮고 pH가 중성인 부근에서 안정하였다. 금속이온인 Hg^{2+} , Ag^{2+} 및 Cu^{2+} 에 의해 강력히 저해를 받았고, 저농도의 EDTA 용액에서는 저해받지 않았으나 고농도인 1 Mole에서는 약 40% 저해되었다. 기질 특이성은 낮았고, methanol과 ethanol에 대한 K_m 값은 각각 2.5, 1.66 mM이었다. 효소의 최대흡광도는 376, 450 nm로 flavin 색소를 함유하고 있다.

참고문헌

- Ogata, K., H. Nishikawa, and M. Oshug. 1969. A yeast capable of utilizing methanol. *Agr. Bio-*

- chem.* **33**: 159.
2. Tani, Y., N. Kato, and H. Yamada. 1978. Utilizing of methanol by yeasts. *Appl. Microbiology* **24**: 165.
 3. Yoshiki Tani. 1984. Methylo-trophic for Biotechnology. Methanol as raw material for fermentative production. *Kor. J. Appl. microbiol. Bioeng.* **12**: 63.
 4. Yoshiki Tani. 1984. Yeast in *C₁-microbiology Technical Rep. Japan yeast Ind. Assoc.* **54**: 71.
 5. Sheldon J.B. Duff and William D. Murray. 1988. Production and Application of methylo-trophic yeast. *Pichia pastoris. Biotechnology and Bioengineering* **31**: 44.
 6. Yoshiki Tani. 1991. Production of useful chemicals by methylo-trophs. *Biology of methylo-trophs.* **38**: 253.
 7. Chiaki Moriwaki, Noriko Inoue, Yoshio Hojima, and Hiroshi Moriya. 1971. A new assay method for the esterolytic activity of Kallikreins with chromotrophic acid. *YAKUGAKU ZASSHI* **91**: 413.
 8. Sham H., H. Schutte, and M.R. Kula. 1982. Methon in Enzymology. *Academic press, New York-London* **89**: 424.
 9. 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**: 680.
 10. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.
 11. Andrews, P. 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* **91**: 222.
 12. Andrew, P. 1965. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595.
 13. Yoshiki Tani, Yasuyosh Sakai and Hideaki Yamada. 1985. Isolation and characterization of a mutant of methanol yeast *Candida boidini* S₂, with Higher Formaldehyde productivity. *Agric. Biolo. Chem.* **49**: 2699.
 14. Hideaki Yamada, Kyu-chul Shin, Nobuo Kato, Sakayu Shimizu and Yoshiki Tani. 1979. Purification and characterization of alcohol oxidase from *Candida* 25-A. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 877.
 15. R. Couderc, and J. Baratti. 1980. Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*, Purification and properties of the Alcohol Oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2279.
 16. Nobuo Kato, Yasuo Omori, Yoshiki Tani and Koichi Ogata. 1976. Alcohol oxidase of *Kloeckra* sp. and *Hansenula polymorpha*. *Eur. J. Biochem.* **64**: 341.
 17. Stephanie Bringer, Benno Sprey and Hermann Sahm. 1979. Purification and properties of alcohol oxidase from *Poria contigua*. *Eur. J. Biochem.* **101**: 563.
 18. Yoshiki Tani, Toyofumi Miya and Koichi Ogata. 1972. Properties of crystalline alcohol oxidase from *Kloeackera* sp. No. 2201. *Agr. Bio. Chem.* **36**: 76.

(Received 21 October 1994)