

***Acetobacter* sp. CS5 Alcohol Dehydrogenase의 분리 및 특성**

김 춘 성 · 송 규 영 · 김 성 준 · 김 호 상 · 박 현 균 · ¹이 숙 영 · ^{†2}박 종 필
조선대학교 대학원 유전자과학과, ¹동신대학교, ²동아인제대학 식품가공과
(접수 : 1999. 7. 1., 게재승인 : 1999. 10. 21.)

Purification and Characterization of Alcohol Dehydrogenase from *Acetobacter* sp. CS5

Chun Sung Kim, Kyu Young Song, Sung Jun Kim, Ho Sang Kim,
Hyun Gyun Park, Sook Young Lee¹, and Jong Phil Park²

Department of Biology, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

¹The Institute for Basic Sciences, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

²Department of Food Science and Technology, Dongainje College, Youngam 526-760, Korea

(Received : 1999. 7. 1., Accepted : 1999. 10. 21.)

Membrane-bound alcohol dehydrogenase(ADH) was purified to homogeneity from the acetic acid producing bacteria, *Acetobacter* sp. CS5. The enzyme was solubilized and extracted with Triton-X and purified using the DEAE-Sephacel chromatography and Sephadryl S-200 chromatography. The enzyme was purified to 14-fold with a yield of 15%. The molecular weight of the purified enzyme was to be 332 KDa. SDS-PAGE of the enzyme showed three subunits with molecular weights of 79 KDa, 49 KDa and 46 KDa. It indicated that enzyme consisted of three subunits of the 79 KDa, two subunits of the 49 KDa and 46 KDa, respectively. The apparent Km value for ethanol was 0.77 mM and the optimum pH and temperature was 4.0-5.0 and 35°C, respectively.

Key Words : *Acetobacter*, alcohol dehydrogenase, SDS-PAGE

서 론

초산균은 그람음성이며 내산성의 편성 호기성 간균 또는 구균으로 포자를 형성하지 않는 세균으로서 당과 alcohol을 초산으로 산화시킬 수 있다. 초산균은 *Acetobacter*와 *gluconobacter* 두종의 속으로 나눌 수 있고(14, 15) 이 두 종의 가장 큰 차이점은 *gluconobacter*는 알콜보다 당을 더 선호하며 초산을 재산화 시킬 수 없는 반면 *Acetobacter*는 TCA cycle을 이용하여 초산을 H₂O와 CO₂로 재산화시키며 보조분자단을 가지고 있다(16). *Acetobacter*는 주로 alcoholic juice가 존재하는 곳에서 많이 발견되며 이와 같은 초산균에 대한 연구는 Persoon(1822)이 sour wine과 beers에서 최초로 보고함으로써 시작되었으며 지금까지 다양한 발효식품으로부터 초산균의 분리에 관한 연구가 보고되고 있다. 최근에는 최적 pH가 4.0이며 methane, methanol, methylamine 등의 환원된 carbon compounds에서도 성장이 가능한 *A. methano-*

*licus*가 보고되었고(6) pH 2.5에서도 높은 nitrogenase activity를 나타내며 고농도의 당에서도 성장하며 glucose로부터 gluconic acid를 생산할 수 있는 *A. diazotrophicus*에 대한 보고도 있다(7). 해남에서 분리한 *Acetobacter* sp. strain CS5는 전통적인 방법으로 식초를 생산하는 균주인데, ethanol을 acetic acid로 전환한 후 TCA cycle을 통해 재산화하며 이때 alcohol을 산화시키는 alcohol dehydrogenase는 세포막에 위치한다. Alcohol dehydrogenase에 관한 연구는 *A. aceti*(13), *A. polyoxogenes*(8) 등에서 많은 연구가 되어 있다. Adachi 등(13)의 보고에 의하면 *A. aceti*의 경우 두 종류의 ADH가 발견되었는데 이중 외막에 존재하는 ADH는 분자량이 149.5 KDa으로 각 분자량이 63 KDa, 44 KDa, 29 KDa, 그리고 13.5 KDa인 4개의 소단위체로 이루어져있고, pH 4.0에서 최적의 활성을 나타내며 정상 세포에서는 pH 2에서도 활성을 보이는 것으로 보고되었다. 또 다른 ADH는 세포질에 존재하는 수용성 ADH로서 이는 NAD를 조효소로 이용한다. 그러나 세포질에 존재하는 ADH의 활성이 외막효소의 활성에 비해 1/300에 불과하다는 점에서 실제 에탄을 산화의 기능은 외막성 ADH가 주역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. Entani 등(2)에 의하면 최근 식초 발효공장에서 직접 분리한 *A. polyoxogenes*에서 정제한 ADH는 분자량이 320 KDa으로 각 분자량이 72 KDa

[†] Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, Dongainje College, Youngam 526-760, Korea

Tel : 062-230-6664, Fax : 062-230-6619

E-mail : Baolokim@hotmail.com

과 44 KDa인 두 소단위체가 3개씩 모여 전효소를 이루며 pH 5.0~6.0사이에서 최적 활성을 보였다. 특히 Tayama 등(8)의 보고에 의하면 40°C에서도 높은 활성을 보였으며 *A.aceti*의 ADH에서 볼 수 없는 aldehyde와 formaldehyde에서도 활성을 보였다. ADH는 초산균을 특성짓는 가장 중요한 효소임에도 불구하고 위에서 살펴본 바와 같이 종간에 분자량과 그 구성뿐만 아니라 생리, 생화학적 특성이 다른 차이점을 보인다는 것이 흥미롭다. 따라서 우리나라에서 분리된 초산균의 ADH를 정제하고 그 특성을 밝히는 것이 단백질의 구조 및 특성이 서로 다른 종간의 효소의 기능적, 진화론적 관계를 규명하는데 도움이 될 뿐만 아니라 세포내 생화학적, 대사조절을 이해하는데 중요하며 아직까지 초산균의 유전자 cloning에 있어 필수적인 vector의 개발이 저조한 상태하에서 유용한 단백질의 정제 및 특성화는 유전자 cloning을 이용한 균주 개량, 초산 생성 및 초산균의 높은 에탄올 저항성의 기작을 이해하는데 있어 필요하다. 따라서 본 연구에서는 한국산 식초에서 분리한 우수초산균인 *Acetobacter* sp. CS5의 ADH를 순수분리정제하여 그들의 생화학적 특성을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 *Acetobacter* sp. CS5와 대조인 *Acetobacter aceti*(ATCC 23746), *A. polyoxogenes*(NBI 1028)를 사용하였다. 배양배지로는 Carr 배지(10 g yeast extract, 30% ethanol, 0.022 g bromocresol-purple, pH 6.8)를 변형하여 사용하였다(7).

Alcohol Dehydrogenase 활성 측정

효소 활성 측정은 Ameyama와 Adachi(10)의 방법을 변형하여 다음과 같은 과정으로 수행하였다. 본 실험에서는 ferricyanide를 사용하여 색깔 변화를 확인하는 방법을 사용하였는데 ethanol 100 μM, McIlvane buffer(pH 4.0) 0.5 mL, Triton X-100 0.1 mL에 효소용액을 넣고 37°C에서 5분간 사전 배양 다음, potassium ferricyanide 10 μM을 넣고 반응을 시작한 15분 후, ferric sulfate Dupanol reagent($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g, SDS 3 g, 85% phosphoric acid 95/1,000 mL)를 0.5 mL 넣어 반응을 끝내고 증류수를 3.5 mL 넣어 잘 섞은 후 37°C에서 20분간 반응시켜 나타나는 prussian blue color를 660 nm에서 활성을 측정하였다. 효소 활성 1 unit는 1분 동안에 1 μmole ethanol의 산화를 촉매하는 양으로 정하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 표준시료화 하는 Bradford(11)의 방법을 이용하여 595 nm에서의 optical density를 측정하였다.

Alcohol Dehydrogenase의 정제

효소의 정제과정은 다음과 같으며 모든 과정은 4°C에서 행하였다. 즉, ethanol 배지에서 배양한 균체를 원심분리하여 수획한 후 washing buffer로 2차례 세척한 다음 원심분리하여 균체(40 g w/w)를 수획하였다. 20 mL의 0.01 M potassium phosphate buffer(pH 6.0)에 혼탁한 균체를 파쇄기로 분쇄한 후 원심분리(120,000

rpm, 1 hr)하여 얻은 침전물을 membrane fraction으로 사용하였다. Membrane fraction을 20 mL의 buffer A(0.01 M potassium phosphate buffer, pH 0.6, containing 1%(w/v) Triton X-100, 10% glycerol)에 혼탁하고 2시간 동안 교반한 후, 원심분리(70,000 rpm, 1 hr)하여 얻은 상층액을 solubilized fraction으로 사용하였다.

DEAE Sephadex(Pharmacia, Co., USA)을 column에 충진하여 buffer A로 평형화시킨 후, solubilized fraction을 적하하여 같은 buffer에 KCl 0.0 M에서 0.5 M까지의 단계별로 만든 동일한 buffer를 이용하여 용출시켜 활성 분획을 얻었다. 이렇게 얻은 활성 분획을 1% Triton X-100이 함유된 0.01 M phosphate buffer(pH 6.0)에서 투석한 후 Sephadex S-200 gel filtration을 수행하였다. 0.01 M phosphate buffer(pH 6.0)로 평형화된 Sephadex S-200 gel filtration(Pharmacia)에 효소 용액을 적하한 후, 단계별로 용출시킨 다음 활성분획을 얻어 0.01 M phosphate buffer(1% Triton X-100)에서 투석, 농축시켜 사용하였다.

Alcohol Dehydrogenase의 특성

Gel filtration chromatography에 의한 분자량 결정

정제된 효소의 분자량을 결정하기 위하여 0.01 M phosphate buffer(0.1% Triton X-100)로 평형화된 Sephadex S-200 gel filtration에 동일한 buffer를 사용하여 용출하였다. 표준시료로는 ferritin(MW 440), yeast alcohol dehydrogenase(MW 150), BSA(MW 66)과 carbonic anhydrase(MW 29)를 사용하였다.

단백질 전기영동

SDS-PAGE는 0.1%(w/v) SDS를 함유한 10% acrylamide gel을 사용하여 Adachi 등(1978)의 방법에 준하여 실시하였다. 표준 시료로는 promega사의 mid-range marker(phosphorylase B(97), serum albumin(66), glutamate dehydrogenase(55), ovalbumin(42), aldolase(40), carbonic anhydrase(31), soybean trypsin inhibitor(21), lysozyme(14)을 사용하였다.

Capillary electrophoresis에 의한 효소의 분석

Neutral capillary methods development kit(Beckman, co. U.S.A)를 사용하여 분리한 단백질의 순수 분리 여부를 알아 보기 위하여 Capillary electrophorator(Beckman, U.S.A)에 citrate(pH 8.0)의 완충액을 사용하여 12.5 kv에서 5초 동안 시료를 접종한 후 peak의 양상을 분석하였다.

효소의 기질 특이성 측정

효소의 기질 특이성을 조사하기 위하여 sodium acetate, gluconic acid, glucose, methanol, mannitol, sorbitol, butanol, octanol, glycerol, fructose, isopropanol, isoamylalcohol, glutaraldehyde, formaldehyde, acetaldehyde, lactic acid를 100 mM 농도로 효소 활성 표준 용액에 넣어 효소 활성을 측정하였다.

효소활성의 최적 온도와 최적 pH

ADH의 최적 온도를 구하기 위하여 cell homogenate 상태에서 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C의 온도에서 McIlvaine buffer(pH 4.0)를 넣어 표준 효소활성 측정방법으로 ADH의 활성을 측정하였다. 그리고 최적 pH를 구하기 위하여 McIlvaine buffer를 사용하여 pH 2.0에서 pH 9.0까지 변화시켜가

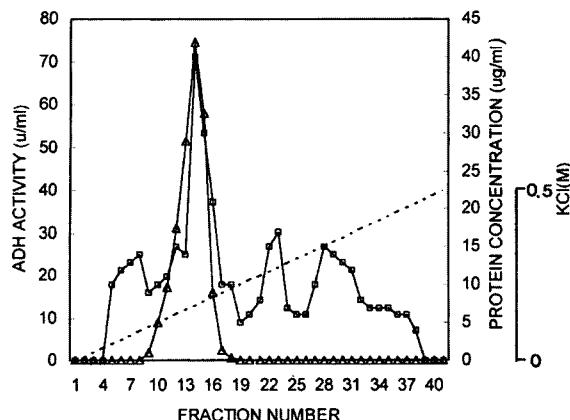


Figure 1. DEAE-sephacel column chromatography of ADH from *Acetobacter* sp. CS5. The enzyme solution was applied to a DEAE-sephacel column (5×20 cm) previously equilibrated with phosphate buffer(0.015 M, 0.1% Triton X-100). The enzyme was eluted with a linear potassium chloride gradient(0.015~0.06 M) at a flow rate of 2 mL/min(\triangle , ADH activity; \square , protein conc.; potassium chloride gradient).

면서 표준효소 측정방법으로 ADH의 활성을 측정하였다.

금속 이온 및 화합물의 영향

ADH에 미치는 금속 이온과 화합물의 영향을 조사하기 위하여 효소 활성을 측정하는 표준 반응 용액에 다양한 화합물들의 최종 농도가 1 mM이 되도록 하여 효소 활성을 측정하였다.

K_m 값 결정

ADH의 두 기질인 에탄올과 potassium ferricyanide의 K_m 값을 구하기 위하여 표준 효소 활성 측정 반응 용액에서 에탄올 농도를 100 mM로 고정시키고 potassium ferricyanide 농도 변화에 따른 반응 속도를 구하고 다시 potassium ferricyanide의 농도를 100 mM로 고정시킨 후 에탄올의 농도 변화에 따른 반응 속도를 구하여 그 결과를 Lineweaver Burk plot을 이용하여 각각의 기질에 대한 K_m 값을 구하였다.

결과 및 고찰

Alcohol dehydrogenase의 정체

파쇄기로 균체를 파쇄하여 DEAE-Sephacel ion exchange chromatography를 수행하여 활성 분획을(Figure 1) Sephadryl S-200 gel filtration에 부착시켜 효소를 분리하고(Figure 2) 효소의 순도를 알아보기 위하여 Capillary electrophorator를 이용하여 분석한 결과 단일 peak를 보임으로서 단일 종류임을 알 수 있었다(Figure 3). 최종 분리된 단백질은 15%의 수율로 14배의 정제도를 나타내었다. 초산균의 ADH는 세포막의 표면에 존재하는 효소로서 에탄올이 초산으로 산화하는 과정에 처음으로 관여하며 기질의 산화는 곧바로 호흡시슬과 연결되어 있으며 pyrroloquinoline quinone(PQQ)을 보겔 분자단으로 가지고 있다(16). 이 효소는 활성을 유지하는데 ammonia를 필요로 하지 않는다는 점에서 메탄올 이용 세균의 ADH(EC 1.1.99.8)와 구별되며(10), cytochrome c와 결합하고 있는 quinohaemo protein이라는 점에서 다른 quinoprotein ADH들과 구분되어진다(3). *Acetobacter* sp. CS5의 ADH는 분리과정에서 120,000 g의 초원심분리 후 침전물

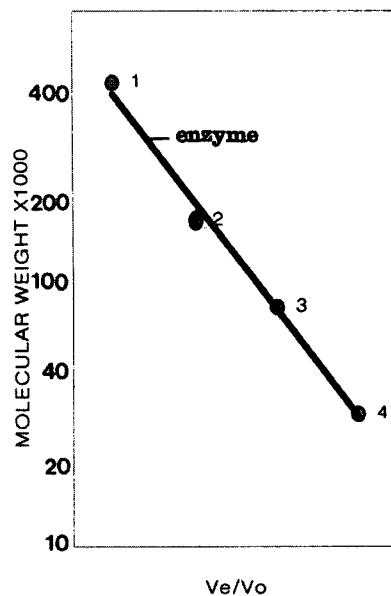


Figure 2. Determination of the molecular weight of ADH from *Acetobacter* sp. CS5 by Sephadryl S-200 gel filtration column chromatography(arrow: ADH of *Acetobacter* sp. CS5, 1: ferritin(MW 440,000) 2: yeast alcohol dehydrogenase(MW 150,000) 3: BSA(MW 66,000) 4: carbonic anhydrase(MW 29,000)).

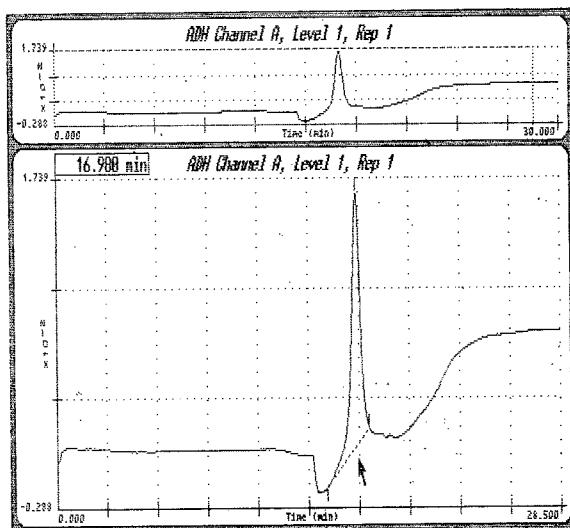


Figure 3. Capillary electrophoretic separation of ADH protein(Beckman, co. neutral capillary methods development kit/protein, citrate pH 8.0, 12.5 kv).

(membrane fraction)에 대부분의 활성이 존재하는 것으로 보아 세포막에 존재하는 단백질임을 알 수 있었다.

분자량 측정

Sephadryl S-200 gel filtration에 의한 분자량의 분석 결과 332 KDa 정도이고(Figure 2) SDS-PAGE gel 전기영동시 각각의 분자량이 79 KDa, 49 KDa, 46 KDa인 3개의 밴드를 확인 할 수 있었다(Figure. 4). *Acetobacter* sp. CS5 균주의 ADH를 기준에 분리된 *A. aceti*, *A. polyoxogens*의 ADH와 비교 분석한 결과(Table 4), CS5 균주로부터 분리된 ADH의 뚜렷한 특징은 진효

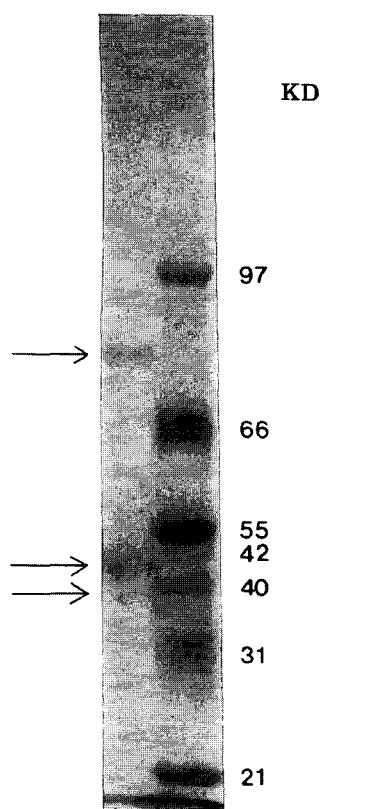


Figure 4. SDS-polyacrylamide gel(12.5%) electrophoresis of purified ADH from *Acetobacter* sp. CS5: lane 1, purified ADH; lane 2, size marker (promega mid-range).

Table 1. Purification steps of ADH from *Acetobacter* sp. CS5.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Crude cell extract	150	2400	16	100
solubilized fraction	70	2815	40	100
DEAE sephacel	9	1600	166	66
Sephadryl S-200	1	360	225	15

소를 이루는 소단위체의 구성단위에 있었다. 분자량은 약 332 kDa으로 *A. polyoxogenes*의 ADH가 각기 같은 분자량을 갖는 3개의 large subunit과 3개의 small unit로 이루어진 반면에, CS5 균주의 ADH는 3개의 large subunit과 분자량이 같은 2개의 subunit가 모인 pentamer로 그 구성 단위면에서 차이가 났으며 *A. aceti*의 ADH와는 구조뿐만 아니라 확인한 차이를 나타내었다.

효소의 기질 특이성

다양한 유기화합물에 대한 정제된 ADH의 활성도는 Table 2에 나타내었다. CS5균주의 ADH는 *A. aceti*와 *A. polyoxogenes*와 비슷하게 aliphatic alcohols에 강한 활성을 보였으나 methanol에는 활성을 나타내지 않았다 (Table 2). 기질 특이성에 있어서는 메탄올을 산화시키지 못하는 점에서 여타의 ADH와 같았으나 aldehydes를 산화시키는 점이 특이하였다. 이러한 기질 특이성

Table 2. Substrate specificity of ADH from *Acetobacter* sp. CS5.

Substrate	Relative activity(%)	Substrate	Relative activity(%)
Ethanol	100	n-Butanol	98
Methanol	0	n-Pentanol	84
Gluconate	0	n-Hexanol	69
Glucose	0	1-Octanol	50
Manitol	0	Formaldehyde	40
Sorbitol	0	Glutaraldehyde	19
Lactic acid	0	Acetaldehyde	27
Glycerol	0	Isopropanol	22

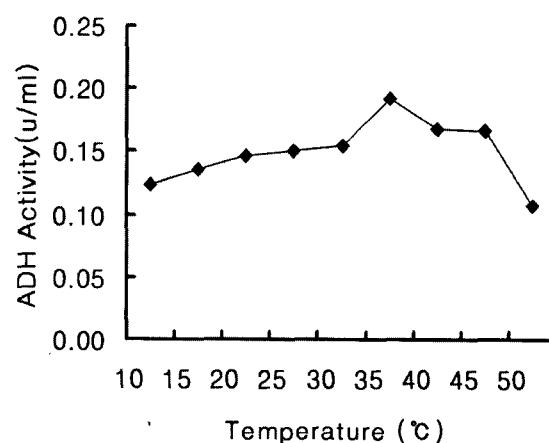


Figure 5. Effect of temperature on ADH activity from *Acetobacter* sp. CS5.

역시 *A. polyoxogenes*의 기질 특이성과 유사한 것으로써 ADH에 의한 aldehyde의 산화는 예외적인 것으로 메탄올 이용 세균과 몇몇 *Pseudomonas* 균주에서 분리된 methanol dehydrogenase의 경우 aldehyde의 산화가 보고되어 있다(1, 4, 12). 이러한 점에서 *Acetobacter* sp. CS5 균주와 *A. polyoxogenes*의 ADH는 다른 미생물에서는 볼 수 없는 새로운 기질 특이성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

효소활성의 최적 온도와 최적 pH

효소활성의 최적 온도를 구하기 위해 10~50°C 온도에서 조사한 결과 35°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Figure 5). 또한 이 효소활성의 최적 pH를 구하기 위해 pH 2.0에서 pH 9.0까지 나타내는 효소 활성을 조사한 결과 pH 4.0~5.0에서 최대의 활성을 나타내었으며 pH 3.0 이하에서는 활성이 급속하게 떨어졌다(Figure. 6). 분리 효소는 pH 4.0~5.0 사이에서 최적상태를 보였는데 이처럼 산성 pH에서 최적 활성을 보이는 것이 초산세균의 ADH의 특성 중 하나이며 알칼리성 pH에서만 활성을 나타내는 메탄올 이용 세균의 primary ADH나 효모와 포유류의 NAD-linked ADH와의 큰 차이점이라 하겠다(5, 4).

금속이온의 영향

금속이온들이 효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 MgCl₂,

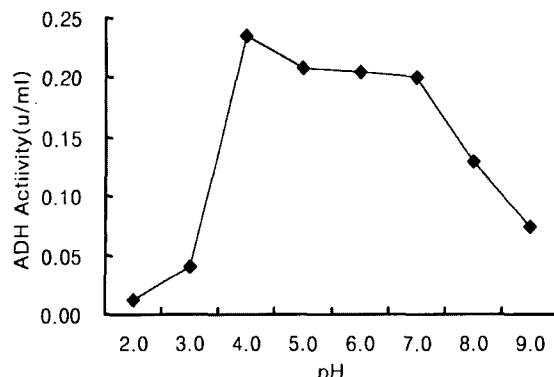


Figure 6. Effect of pH on ADH from *Acetobacter* sp. CS5 in mcllvaine buffer(pH 2.5~9.0).

Table 3. Effect of various compounds on ADH activity from *Acetobacter* sp. CS5*.

Compound(1 mM)	Remaining activity(%)
none	100
NaN ₃	87
EDTA	90
CuSO ₄	60
ZnCl ₂	74
NiCl ₂	70
MnCl ₂	59
MgCl ₂	54
CoCl ₂	55
CaCl ₂	42

* The enzyme was incubated with compound for 10 min before measuring activity.

CoCl₂, CaCl₂는 효소활성을 저해하였으며 sodium azide, EDTA는 효소활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 3).

Km 값 결정

효소의 Km값을 측정하기 위하여 기질인 에탄올의 농도를 변화시켜 그 속도를 구한 다음, 그 결과를 Lineweaver Burk plot으로 나타낸 결과 에탄올에 대한 Km값은 0.77 mM이었다.

결국 ADH의 특성만을 고려한다면 CS5균주는 *A. aceti*보다는 *A. polyoxogenes*와 유연관계가 깊은 종으로 생각할 수 있으나 초산세균의 분류체계에서 중요시되고 있는 ubiqinone system에서는 Q₉으로 *A. aceti*와 그 특성을 같이한다(9). 이는 현재의 초산균의 분류 체계가 불완전하다는 것을 말해주는 결과라 하겠다. 따라서 초산균의 분류에 있어서 기준의 생리, 생화학적 특성 및 화학적 분류방법(chemotaxonomy)과 함께 ADH의 특성도 주요한 분류기준에 포함시켜야 할 것이다.

근연종 사이에서 나타나는 단백질 구조 및 특성의 이러한 상이성은 ADH가 *Acetobacter*를 특징짓는 가장 중요한 효소라는 점에서 매우 흥미로운 사실로 생각되며 초산균의 ADH를 분리하여 특성화하고 유전자를 cloning함으로써 아미노산 서열 및 DNA염기 서열의 비교를 통한 상동성을 연구하는 것은 초산균의 분류체계를 밝히는데 매우 유용한 방법이 될 뿐 아니라, 산업적으로 효소의 특성을 바탕으로 한 고효율의 발효기의 개발과

Table 4. Comparison of ADHs characteristics of the strains of *Acetobacter* sp. CS5.

M.W. and structure	<i>A. aceti</i> ¹	<i>A. polyoxogenes</i> ²	CS5 strain
	160 KDa tetramer (63, 44, 29, 13)	320 KDa hexamer (3 subunits of 72 and 3 subunits of 44)	332 KDa pentamer (3 subunits of 79 subunit of 46, 49)
Optimum pH and Temp.	4.0 30°C	5.0~6.0 40°C	4.0~6.0 35°C
Km value	1.7 mM	1.2 mM	0.7 mM

¹ Data from reference 13, ² Data from reference 8

에탄올 저항성의 기작을 규명하고 높은 생산성을 갖는 균주의 개량에도 크게 기여할 것으로 생각된다.

요 약

초산생성 미생물인 분리균주 *Acetobacter* sp. CS5로부터 alcohol dehydrogenase(ADH)를 순수분리하였다. 이 효소는 Triton-X로 solubilization시킨 후 DEAE-Sephacel chromatography와 Sephadryl S-200 chromatography에 의해서 순수 분리되었다. 그 결과 15%의 수율과 14배의 정제된 효소를 얻었다. 정제된 효소의 분자량은 332 KDa으로 측정되었다. 또한 SDS-PAGE상에서는 분자량이 79 KDa, 49 KDa, 46 KDa인 3개의 band를 확인하였고, 3분자의 79 KDa 소단위체와 각각 1분자인 49 KDa과, 46 KDa인 소단위체로 이루어졌음을 확인하였다. 에탄올에 대한 Km값은 0.77 mM이었으며 최적 pH와 온도는 각각 pH 4.0~5.0과 35°C이였다.

감 사

이 논문은 (1997)년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

참 고 문 헌

- Groen, B., J. Frank and J. A. Duine (1987), Quinoprotein alchol dehydrogenase from ethano-grown *Pseudomonas aeruginosa*, **23**, 921-924.
- Entani, E., S. Ohmori, H. Masai and K. Suzuki (1985), *Acetobactor polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic bacteria useful for producing vinegar with high activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **31**, 475-490.
- Shinagawa, E., K. Matsushita, O. Adachi and M. Ameyama (1989), Formation of the apo-form of quinoprotein alchol dehydrogenasefrom *Gluconobacter suboxydans*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1823-1828.
- Sperl, G. T., H. S. Forrest and D. T. Gibson (1974), Substrate specificity of the purified primary alchol dehydrogenase from methanol-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.*, **118**, 541-550.
- Sund, H and M. Theorell (1963), Alchol dehydrogenase. In Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrbäck, K.(ed.) 25-83. *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New york.

6. Duine, J. A., J. Frank, Jr. and J. A. Jongejan (1987), *Advances in Enzymology*, (A. Meister,eds), Vol. **59**, 169, John Wiley and sons New York.
7. Carr J. G. (1968), Method for identifying acetic acid bacteria, pp. 1-8. In B. M. Gibbs and D. A. Shapton(ed.), *Identification Methods for Microbiologists*, part B, Academic Press Inc., London.
8. Tayama, K., M. Fukaya, H. Okumura, Y. Kawamura and T. Beppu (1989), Purification and characterization of membrane bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 181-185.
9. Lee, Byung Kwon, Hong-Sung, Chun, and Sung-Jun Kim (1993), Isolation and characterization of *Acetobacter* sp. CS Strains from Heanam vinegar. *Kor. J. Microbial.*, Vol. **31**(2), 99-104.
10. Ameyama, M and O. Adachi (1982), Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria membrane-bound. In: Wood Wa(ed), *Methods in Enzymology*, **89**, 450-457.
11. Bradford M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
12. Rupp, M and H. Gorisch (1988), Purification crystallization and characterization of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol. Chem.*, **369**, 431-439.
13. Adachi, O., E. Miyagawa, E. Shinagawa, K. Matsushita and M. Ameyama (1978), Purification and properties of particulate dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2331-2340.
14. Asai, T., H. Iizuka and K. Komagata (1964), The flagellation and taxonomy of genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* with reference to the existence of intermediate strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 95.
15. Asai, T. (1968), *Aceti Acid Bacteria*, University of Tokyo Press, Tokyo.
16. Inoue, T., M. Takagi and K. Yano (1989), Cloning and sequencing of the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.*, **171**, 3115.