

Methanol 變化細菌에 관한 生物學的 研究

李永祿 · 曩光星 · 朴正浩

(高麗大學校 生物學科)

A Biological Study on the Methanol-Utilizing Bacteria

LEE, Yung Nok, Kwang Sung BAE and Chung Ho PARK

(Dept. of Biology, Korea University)

ABSTRACT

By the successive enrichment culture, more than 250 methanol-utilizing bacteria were isolated from various samples such as soil, waste water and sewage.

Two strains of which were selected and tentatively identified as *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp.

Experiments were carried out to determine the growth conditions for the higher biomass yield and to demonstrate the difference in protein composition dependent upon carbon sources of these two species. The results were as follows;

1. The optimum pH was determined as 8 in the both species. The optimum temperature in *Acinetobacter* sp. was 25°~30°C and *Pseudomonas* sp. was 30~35°C. The optimum initial concentration of methanol was determined as 1~2% in *Acinetobacter* sp. and 2~3% in *Pseudomonas* sp.

2. The optimum concentrations of nitrogen source, micro-elements, and vitamins such as biotin and thiamine-HCl in *Acinetobacter* sp. were 1g (NH₄)₂SO₄, 1~3mg Mn⁺⁺, 4mg Fe⁺⁺, 10μg biotin, and 100μg thiamine-HCl per liter medium. In the *Pseudomonas* sp., 2g (NH₄)₂SO₄, 1mg Mn⁺⁺, trace amounts of Fe⁺⁺, 5μg biotin and 100μg thiamine HCl per liter were effective. Maximum biomass yield was 2.5g/l in *Acinetobacter* sp. and 4.8g/l in *Pseudomonas* sp.

3. Protein composition of the two strains exhibited that alkali-labile protein was higher than alkali-stable protein. In *Pseudomonas* sp., the contents of acid soluble fraction and alkali-stable protein of the cells grown in the methanol medium were higher than in sucrose medium. On the other hand, in *Acinetobacter* sp., alkalilabile protein of the cells grown in sucrose medium was higher than in methanol medium.

서 론

Whittenbury *et. al.*, (1970), Mateles와 Chalfan(1972), Cooney(1975) 등에 의한 최근의 연구로 미생물학적으로나 화학공학 적 관점에서 볼때 발효공정에서 유리한 점이 많은 메탄올로부터의 SCP(Single Cell Protein)생산을 위한 메탄올 자화세균의 이용가치가 입증되었다.

Cooney(1975), Mateles(1975) 등이 지적 한바와 같이 SCP생산에 있어 메탄올은 메 탄이나 다른 탄수화물보다 유리한 점이 있 다. 즉, 메탄올은 값이 싸고 자원이 풍부하 며 물에 잘 용해되어 취급이나 저장에 편리 하다는 것과 메탄올을 이용할 수 있는 미생 물의 수가 제한되어 있어 오염의 문제가 극 소화 된다는 점 등이다.

이 논문은 문교부 학술 연구조성비의 도움을 받았다.

Söhngen's에 의하여 1906년에 처음으로 methylotroph인 *Bacillus methanicus*가 분리된 이후로 1966년까지 단지 3종류의 메탄올 자화세균이 보고되었다. 그러나 그 후 Whittenbury *et al.* (1970), Kouno와 Ozaki (1975) 등에 의해 100여종의 그람음성이며 절대 호기성인 메탄올 자화세균이 분리되었고 Cooney와 Levine(1972)은 batch culture에서 메탄올과 메탄에서 자랄 수 있는 많은 미생물을 종합 보고하였다. 메탄올 자화세균은 탄소화합물의 자화양식에 따라 절대메탄올 자화세균, 메탄올-메틸아민 자화세균 조건메탄올 자화세균등의 3가지 유형으로 구분되는데 조건메탄올 자화세균의 대부분은 호기성 *Pseudomonas*이다.

우량균주의 개발과 균주의 생물학적 특성 및 적절한 배양조건등에 관한 연구는 보다 효율적인 SCP생산을 위해 끊임없이 요구되며, 대규모 생산에 앞서 해결되어야 할 기본과제라 할 수 있다. 그러나 국내에서는 아직 메탄올 자화세균의 분리 및 생리학적 성질에 대한 보고가 거의 없었다. 본 연구에서는 메탄올을 에너지원이나 탄소원으로 자화할 수 있는 세균을 분리하여 우량균주를 선별하고 이 세균들의 생체량을 최대로 증가시키는 생장조건을 구명함과 동시에 탄소원에 따른 세포의 단백질 조성의 차이점등을 측정 비교하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

토양, 하수 또는 공장폐수등 여러가지 표품으로부터 250여 균주의 메탄올 자화세균을 분리하여 본 연구의 실험재료로 사용하였다.

2. 배지의 조성

토양이나 하수, 공장폐수 등의 표품들로부터 메탄올 자화세균의 분리를 위하여 Kouno *et. al.* (1973)의 기본 메탄올 배지 (Basal methanol medium BMM)을 사용하였다. 이 배지의 조성은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g,

KH_2PO_4 2g, K_2PO_4 7g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g yeast extract 0.1g, Biotin 10 μg , Thiamine-HCl 100 μg , $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mg, 메탄올 20ml 증류수 1,000ml이며 pH 7.5~7.8로 조정하였다. 고체배지는 BMM에 1.5%의 agar를 넣어 사용하였다. 배지조성에 따른 성장물의 영향은 BMM배지상의 어느 한 종류의 조성을 다르게 하여 실험하였다.

3. 세균의 분리 및 보존

표품 0.1g을 20ml의 BMM이 들어있는 플라스크에 넣어 28~30°C에서 3일간 진탕 배양한 후 다시 새로운 BMM로 옮겨 3일간 진탕하여 농화배양하였다. 농화배양한 것을 BMM고체 배지에 옮겨 5일간 28°C에서 배양하였다. 5일후 고체배지상에 나타난 균락들을 분리하여 BMM에 옮겨 3일간 진탕 배양하였다. 이 과정을 3~4번 반복하여 메탄올 자화세균을 순수배양하고 분리한 균주는 5°C에서 보존하였다.

4. 균주의 선별

분리한 메탄올 자화세균 중 가장 우수한 메탄올 자화능을 가진 균주의 선별은 BMM에서의 성장율을 540nm와 660nm에서의 흡광도로 측정하여 선별하였으며 다른 하나의 균주는 BMM고체 배지상에서 선별된 균주와는 다른 특이한 형태적 특성, 색소형성, 균락형태 등을 나타내는 균주를 선정하였다.

5. 균주의 동정

선별한 균주는 Bergey's Manual of determinative Bacteriology 8th edition (Buchanan and Gibbons, eds, 1974)과 Microbial Growth on C₁-Compounds(The Society of Fermentation Technology, Japan, 1975) 등을 참조하여 세포의 형태, 운동성, 생리적 특성등에 의거하여 동정하였다.

6. 생장을 및 생체량의 측정

모든 성장실험은 25ml의 배지를 100ml의 플라스크에 넣어 30°C에서 3일간 진탕배양한 것을 540nm와 660nm에서의 흡광도로 측정하여 균체성장을 측정하였으며 건조중

량은 배양액을 8,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 증류수로 세척하여 105°C에서 24시간 건조시켜 측정하였다.

7. 세포의 분획

본 실험에 사용한 두 균주를 탄소원을 달리하여 각각 메탄올과 슈크로오스를 첨가한 배지에서 30°C에서 5일간 배양한 후 세포를 수확하여 세포구성물질을 Schmidt-Tannh-auser법(1945)에 의거하여 Table 1과 같이 분획하였다.

그 처리순서는 다음과 같다.

- (I) 5% PCA로 2회(30분, 15분)
- (II) 95%와 75% ethanol로 각각 1회
- (III) Hot ethanol : ether(3 : 1)로 3회~4회

(IV) 0.5N KOH로 37°C에서 16~18시간 처리하여 침전물을 제거하고

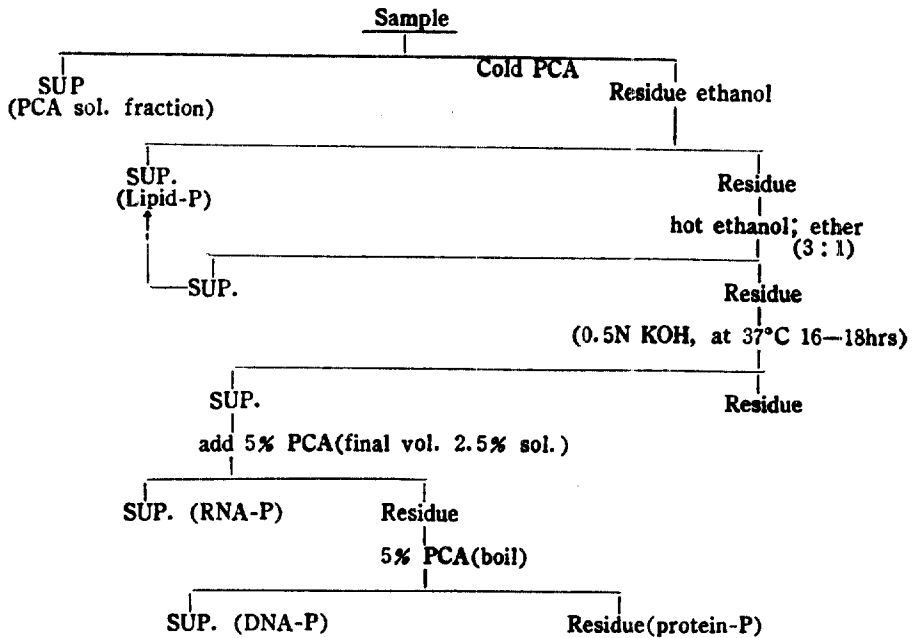
(V) 상등액에 5% PCA를 가하여 2.5% 용액이 되게 하여

(VI) 침전된 DNA단백을 5% PCA에 현탁하여 15분간 100°C에서 가열하여 단백질질을 침전시켰다.

8. 단백질의 정량

Table 1에 표시한 바와같이 조작(I)에서 얻은 상등액을 유리아미노산, 조작(V)에서 얻은 상등액을 alkali-labile protein, 조작(VI)에서 얻은 침전물을 alkali-stable protein으로 보고 ninhydrin반응(Troll and Cannon, 1953)을 이용하여 각 분획의 단백질질을 정량하였다.

Table 1. Fractionation of Phosphate Compounds in two strains



결과 및 고찰

1. 우량균주의 선별

일차선별 실험에서 분리한 250여종의 메탄올 자화세균중 먼저 생장율이 우수하다고 생각되는 여섯 균주를 선별하였다. 그 결과

를 Table 2에 표시한다.

이차선별 실험에서는 Table 2에서 보는 바와같이 성장율이 가장 우수하다고 생각되는 균주로서 161번 균주를 선별하고 다른 하나의 균주는 이와는 형태적으로 아주 다르다고 생각되는 균주를 선별하여 실험에 사용하였다. Table 3에 이 두 균주의 생장

Table 2. Growth rate of selected methylotroph

Strain No.	OD		Source
	540nm	660nm	
65	0.91	0.67	불 광 천
80	0.85	0.63	원 주 개 천
94	0.89	0.67	청 계 천
121	0.85	0.59	천 마 산
161	0.94	0.72	청 계 천
172	0.95	0.64	부산 제일 제당 폐수

Table 3. Comparison of growth rate and pigment production of two isolates

Strain No.	OD		Sample area	Color
	540nm	660nm		
18	0.40	0.27	의 정 부 는	Orange
161	0.94	0.72	청 계 천	White, Yellow, Pinkish white

을 및 색소형성을 비교하였다.

2. 선별한 균주의 동정

두 균주의 형태적 특징을 Table 4에 나타내었다. 이와같은 형태적인 특성으로 보아 두 균주는 각각 *Neisseriaceae*와 *Pseudomonadaceae*에 속하며 *Neisseriaceae*에 속하는 균주는 Fig. 1에서 보는 바와같이 세포의 형태가 대수기에는 막대형이나 정지기에는 구형이며 BMM배지에서 생장이 가능하고 Nitrate로 환원이 안되는 생리적 특성으로 보아 *Acinetobacter*속으로 동정하

였다.

*Pseudomonadaceae*에 속하는 균주는 Peel and Quayle (1961)와 Anthony and Zaman(1964)등이 보고한 *Pseudomonas* AM1이나 *Pseudomonas* sp. M27과 거의 비슷한 형태적 및 생리적 특성을 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와같이 single polar flagella에 의해서 운동성이 있으며 세포의 형태는 gram염색이 안되는 막대형의 세포인 점에서 *Pseudomonas*속으로 동정하였다.

Table 4. Morphological characteristics of two strains

	<i>Acinetobacter</i> sp. (18)	<i>Pseudomonas</i> sp. (161)
Source	Soil(Rice field)	Waste Water
Shape of the Cell	Oval or Rod	Rod
Size of the Cell	Oval(0.8~1.0) × (1.0~1.2) μm Rod(1.0~1.2) × (2.8~3.0) μm	(0.8~1.2) × (3.0~3.5) μm
Pigment of Colony	Orange	Pinkish white
Motility	-	+
Flagella	None	Polar
Gram reaction	--	-
Growth on 45°C	-	-

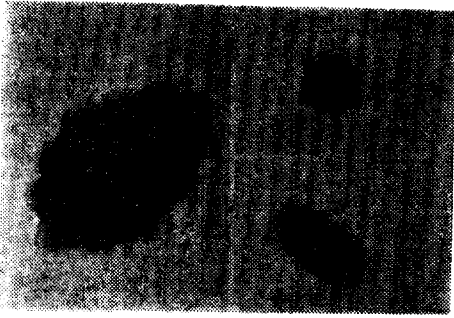


Fig. 1. Electron micrograph of *Acinetobacter* sp. ($\times 10,000$) (left) Colony formation of *Acinetobacter* sp. (upper right) Oval type of *Acinetobacter* sp. (lower right) Rod type of *Acinetobacter* sp.



Fig. 2. Electron micrograph of *Pseudomonas* sp. ($\times 10,000$)

3. *Pseudomonas* sp.와 *Acinetobacter* sp.의 배양특성

① 배양시간과 생체량

배양시간에 따른 성장율을 Fig. 3에 표시하였다. *Pseudomonas* sp.는 2~3일 후에 정지기에 도달하였으나 *Acinetobacter* sp.는 이보다 훨씬 늦은 4~5일 후에 정지기에 도달하였다. 이것으로 보아 SCP생산을 위

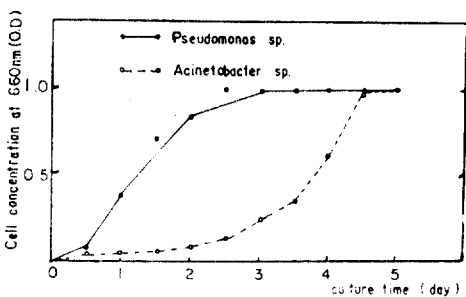


Fig. 3. Growth curve in batch culture.

한 균주로는 *Acinetobacter* sp.보다는 *Pseudomonas* sp.가 유리한 것을 알 수 있다.

② 성장율에 미치는 pH의 영향

Fig. 4에 표시한것 처럼 두 균주는 모두 알칼리 영역에서 잘 자랐는데 특히 pH 8.0 근처에서 높은 균체량을 나타내었다. *Pseudomonas* AM1의 최적pH는 7.0이며 pH 5.0이하에서는 생장이 안되는 점에서 비슷한 결과를 나타내었다.

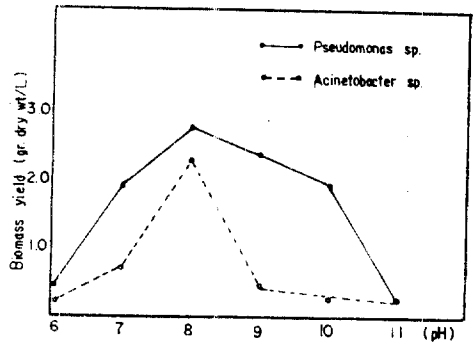


Fig. 4. Effect of pH on biomass yield after 3-day incubation.

③ 성장율에 미치는 온도의 영향

두 균주의 성장과 온도와의 상관관계를 Fig. 5에 나타내었다. *Acinetobacter* sp.는 25~30°C에서 좋은 성장을 하였으며 *Pseudomonas* sp.는 30~35°C에서 최대의 균체수율을 나타내었다. *Pseudomonas* AM1이나 *Pseudomonas* sp. M27에서도 30°C가 최적온도로서 알려져 있다.

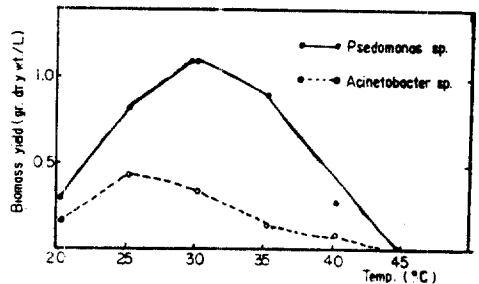


Fig. 5. Effect of temperature on biomass yield after 3-day incubation.

4. 성장에 미치는 탄소원의 영향

① 메탄올의 농도에 따른 생체량의 변화

Acinetobacter sp.는 배양초기의 배지의 메탄올 농도를 1~2%로 하였을때 가장 높은 균체량을 나타내었으나 *Pseudomonas* sp.에서는 2~3% 농도에서 가장 좋은 성장을 나타내었다. (Fig. 6)

Pseudomonas AM1은 메탄올농도를 1%보다 높게 가해주면 생장이 감소되며 5%의 메탄올농도에서는 완전히 생장이 억제된다고 알려져 있다. 또한 *Pseudomonas* sp. M27균주는 0.4%농도의 메탄올을 필요로 하고 있는 반면에 본 실험에서 사용된 *Pseudomonas* sp.는 보고된 많은 메탄올 자화세균에 비하여 더욱 높은 메탄올농도에서 생장이 가능한 점에서 메탄올에 대해 덜 민감한 것으로 생각된다.

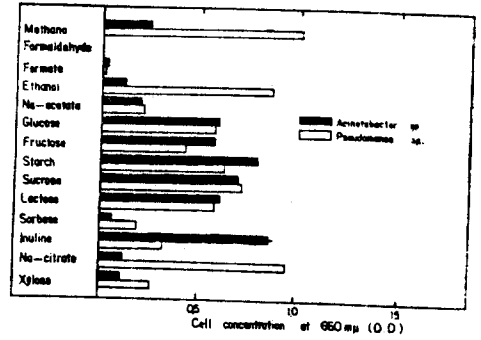


Fig. 7. Growth of two sp. on various carbon sources

성장을 나타내었으며 또한 메틸아민을 질소원으로 이용하지 못하였다.

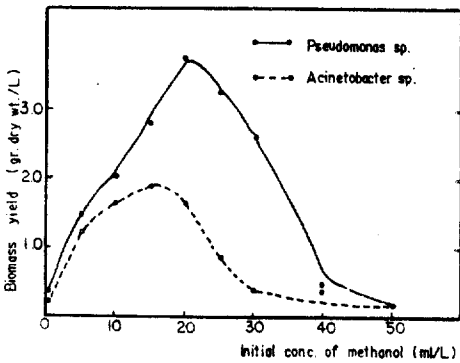


Fig. 6. Effect of initial conc. of methanol on biomass yield after 3-day incubation.

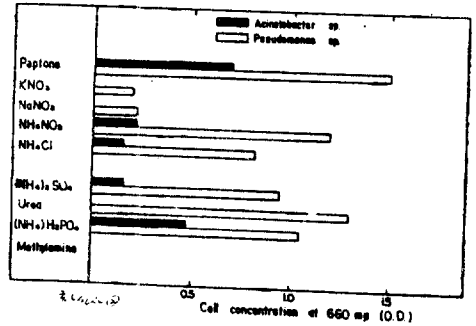


Fig. 8. Growth of two sp. on various nitrogen sources

② (NH₄)₂SO₄의 농도에 따른 성장율의 변화

Fig. 9에 표시한 바와같이 *Acinetobacter* sp.는 (NH₄)₂SO₄의 농도가 0.1%일때 가장

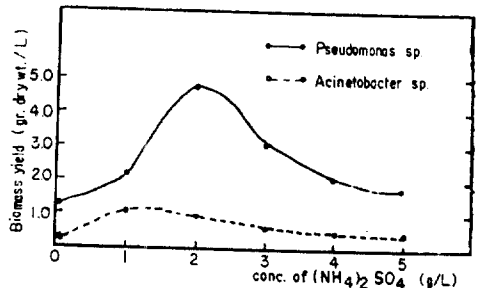


Fig. 9. Effect of (NH₄)₂SO₄ as nitrogen source on biomass yield after 3-day incubation.

② 다른 탄소원의 이용

각 탄소원에 따른 비교 성장도를 Fig. 7에 나타내었다. *Acinetobacter* sp.는 탄소원으로 메탄올 보다는 Starch, Sucrose, Inulin과 같은 기질에서 더 잘 성장하였으며 *Pseudomonas* sp.는 다른 탄소화합물 보다는 메탄올에서 더 잘 성장하는 것을 알 수 있었다.

5. 성장에 미치는 질소원의 영향

① 질소원의 이용

두 균주의 여러 질소화합물의 동화능을 Fig. 8에 비교하여 표시하였다. 두 균주가 모두 무기질소원 보다는 peptone에서 좋은

높은 수율을 나타내었다. 그러나 *Pseudomonas* sp.에서는 0.2%의 농도에서 가장 높은 균체량을 얻을 수 있었다. 이때의 건조중량은 4.8g/l이었다.

6. 생장에 미치는 비타민 및 무기염류의 영향

① biotin 및 thiamine의 영향

Fig. 10에 표시한 바와같이 *Pseudomonas* sp.에서는 5 μ g/l, *Acinetobacter* sp.에서는 5~10 μ g/l의 비오틴을 첨가해 주었을때 두 균주가 모두 약간의 성장증가를 나타내었다.

한편 티아민은 Fig. 11에서 보는 바와같이 *Pseudomonas* sp.는 50~100 μ g/l, *Acinetobacter* sp.에서는 100~200 μ g/l을 가하여 줌으로서 최대 균체수율을 얻을 수 있었다.

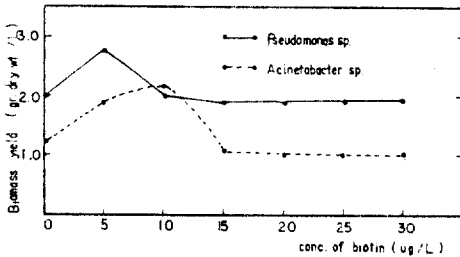


Fig. 10. Effect of biotin on biomass yield after 3-day incubation.

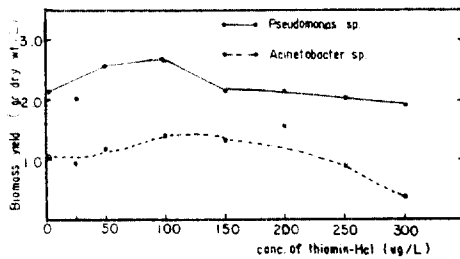


Fig. 11. Effect of thiamin-HCl on biomass yield after 3-day incubation.

② Fe⁺⁺이온과 Mn⁺⁺이온의 영향

Fig. 12와 Fig. 13에 표시한 바와 같이 *Acinetobacter* sp.는 4~5mg/l의 Fe⁺⁺이온을 포함하는 배지에서 특히 성장이 좋았다. 그러나 *Pseudomonas* sp.에서는 Fe⁺⁺이온 농도에 따라서 생체량은 증가되지 않았다.

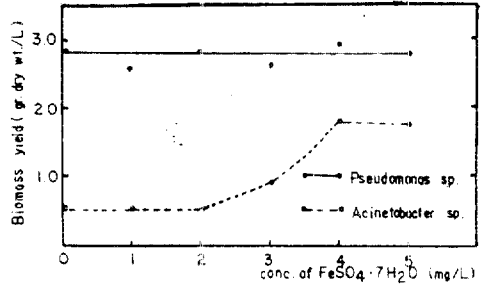


Fig. 12. Effect of Fe⁺⁺ ion on biomass yield after 3-day incubation.

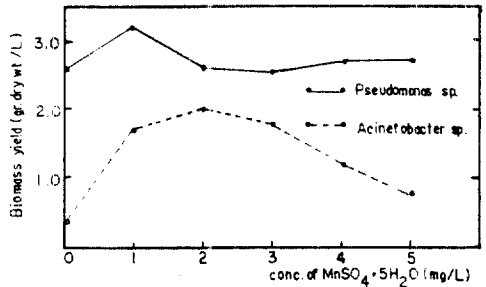


Fig. 13. Effect of Mn⁺⁺ ion on biomass yield after 3-day incubation.

Pseudomonas sp.에 있어서는 극히 소량의 Fe⁺⁺이온이 존재한다면 성장에는 별 영향이 없는 것 같다. 배지내에는 0.1g의 yeast extract가 첨가되므로 여기에 미량으로 포함되어 있는 미량원소만으로도 성장에 필요한 양은 충족되는 것으로 생각된다. 한편 *Acinetobacter* sp.는 1~3 mg/l의 Mn⁺⁺이온 첨가로 성장이 촉진되었으며 *Pseudomonas* sp.에서는 1mg/l의 Mn⁺⁺이온 농도에서 극대의 성장율을 나타내었다.

이상의 실험에서 얻어진 두 균주의 최적 배양조건을 종합하여 Table 5에 표시하였다.

본 실험에 사용된 두 균주 중 SCP생산을 위하여는 *Pseudomonas* sp.가 적당한데 *Pseudomonas* sp.는 성장하는데 있어 *Acinetobacter* sp.보다는 여러가지 성장요소를 덜 요구함을 알 수 있었다. 다만 현재까지 연구된 바로는 연속배양에 있어 배탄율을 이용한 생체 수율이 효모에서 4~5g/l 정도로 알려져 있다.

Table 5. Optimum condition for growth of two strains

	Acinetobacter sp.	Pseudomonas sp.
Culture time (day)	4~5	2~3
pH	8	8
Temperature (°C)	25~30	30~35
Initial methanol Concentration	1~2%	2~3%
(NH ₄) ₂ SO ₄ Conc.	0.1%	0.2%
Biotine (μg/l)	5~10	5
Thiamine (μg/l)	50~100	100~200
Fe ⁺⁺ (mg/l)	4~5	trace
Mn ⁺⁺ (mg/l)	1~3	1

본 연구에서 얻은 *Pseudomonas* sp.의 batch culture에 있어서의 4.8g/l의 생체량은 대단히 높은 것이라 할 수 있다. 연속배양에 있어서는 batch culture에 비해 보통 3배 이상의 수율을 얻을 수 있으므로 만약 이 균주를 사용하여 연속배양을 한다면 훨씬 높은 균체수율을 얻을 수 있으리라고 생각된다.

7. 탄소원에 따른 단백질 함량의 변화

탄소원을 달리하여 배양한 균체를 분획하여 각각 유리아미노산, alkali-labile protein, alkali-stable protein의 함량변화를 측정하고 그 결과를 Fig. 14에 표시하였다. Fig. 14에서 보는 바와 같이 메탄올을 탄소원으로 사용한 배지에서 배양한 *Pseudomonas* sp.의 유리아미노산과 alkali-stable protein의 양은 슈크로오스를 탄소원으로 사용하여

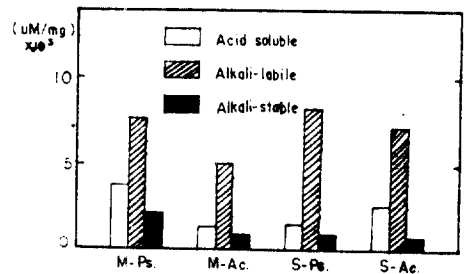


Fig 14. Changes in amounts of ninhydrin reactive substances in each fraction of the two strains.

배양한 것 보다도 높은 값을 나타내었다. *Acinetobacter* sp.에 있어서는 alkali-labile protein 함량이 슈크로오스배지에서 배양한 것 보다도 메탄올배지에서 배양한 것이 오히려 감소하였다.

적 요

메탄올을 탄소원으로 이용할 수 있는 세균 250여 균주를 분리하여 그중 두 균주를 선별하여 동정한 결과 *Acinetobacter* sp.와 *Pseudomonas* sp.로 판명되었다. 두 균주의 균체 수율을 최대로 높일수 있는 배양조건 및 탄소원에 따른 단백질 조성의 차이점등을 측정 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Acinetobacter* sp.의 최고 균체수율을 위한 배양시간, 최적온도, pH는 각각 4~5일, 25~30°C 및 8이였으며, *Pseudomonas* sp.는 각각 2~3일, 30~35°C 및 8이였다.

또한 초기 메탄올의 최적농도는 *Acinetobacter* sp.는 1~2%이며, *Pseudomonas* sp.는 2~3%이였다.

2. *Acinetobacter* sp.에 있어서 무기염류 및 비타민의 요구정도는 Mn⁺⁺이온이 1~3mg/l, Fe이온⁺⁺이 4mg/l이였으며 0.1%의 (NH₄)₂SO₄에서 극대의 성장율을 나타내었다.

Pseudomonas sp.에 있어서는 1mg/l의 Mn⁺⁺이온과 극히 미량의 Fe⁺⁺이온, 그리고 (NH₄)₂SO₄가 0.2%일때 최대균체 수율을 얻을 수 있었다. 두 균주는 모두 비타민 중 thiamine을 100μg/l 정도로 첨

가한 배지에서 좋은 성장을 보였으며, biotin을 5 μ g/l 정도의 농도로 첨가해 주었을때 모두 균체수율이 증가되었다. 이때의 최고 균체수율은 *Acinetobacter* sp.에서는 2.5g/l, *Pseudomonas* sp.는 4.8g/l이었다.

3. 단백질 함량의 변화는 두 균주 모두 alkali-labile protein이 alkali-stable protein보다 단백질 함량이 많았고, *Pseudomonas* sp.에서의 유리아미노산 및 alkali-stable protein 함량은 메탄올 배지에서 배양한 것이 sucrose 배양에서 보다 훨씬 높았다.

Acinetobacter sp.에서의 alkali-labile protein 함량은 sucrose 배지에서 배양한 것이 메탄올에서 보다 오히려 높은 값을 나타내었다.

REFERENCES

1. Anthony, C., L.Z. Zatman. 1964. The microbial oxidation of methanol. 1, Isolation and properties of *Pseudomonas* sp. M27. *Biochem. J.* **92**: 609.
2. Asthana, H., A.E. Humphrey and V. Moritz. 1971. Growth of on methanol as the sole carbon substrate. *Biotech. Bioeng.* **13**, 923.
3. Battat, E., I. I. Goldberg and R.I. Matelese. 1974. Growth of *Pseudomonas C* on C₁-compounds, continuous culture. *Appl. Microbiol.* **28**, 906.
4. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons eds. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
5. Cooney, C.L., and D.W. Levine. 1972. Microbial utilization of methanol. *Advan. Appl. Microbiol.*, **15**, 337.
6. Cooney, C.L. 1975. Engineering considerations in the production of Single-Cell Protein from methanol. *Microbial Growth on C₁-compounds.*, p 183—197, Tokyo, Japan.
7. Dahl, J.S., R.J. Metha, D.S. Hoare. 1972. New obligate methylotroph. *J. Bacteriol.* **109**, 916.
8. Dworkin, M., J.W. Foster. 1956. Studies on *Pseudomonas methaima* (Söhngen). *Nov. Comb., J. Bacteriol.* **72**, 646.
9. Kouno, K., T. Oki, H. Nomura and A. Ozaki., 1973. Isolation of new methanol-utilizing bacteria and its Thiamin requirement for growth. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **19**, 11
10. Kouno, K., and A. Ozaki. 1975. Distribution and identification of methanol-utilizing bacteria. *Microbial Growth on C₁-compounds.* p 11—21, Tokyo, Japan.
11. Levine, D.N. and C.L. Cooney. 1973. Isolation and characterization of a thermotolerant methanol utilizing yeast. *Appl. Microbiol.* **26**, 982.
12. Mateles, R.I. and Y. Chalfan. 1972. New *Pseudomonad* utilizing methanol for growth. *Appl. Microbiol.* **23**, 135.
13. Mateles, R.I. 1975. Process aspects of continuous culture for SCP production with methanol as a substrate. *First ISC. IAMS proceedings.* Tokyo, Japan.
14. Peel, D. and J.R. Quayle. 1961. *Microbial Growth on C₁ Compounds* 1. Isolation and Characterization of *Pseudomonas* AM1 *Biochem. J.* **81**, 465.
15. Quayle, J.R. 1975. Unsolved problems in the microbial metabolism of methane and methanol. *Microbial Growth on C₁-compounds.* 59—65.
16. Schmidt, G. and S.J. Tannhauser. 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.* **161**, 83—89.
17. Snedecor, B. and C.L. Cooney. 1974. Thermophilic mixed culture of bacteria utilizing methanol for growth. *Appl. Microbiol.* **27**, 112.
18. Stocks, P.D, and C.S. McCleskey. 1964. Identity of the pinkpigmented methanol-oxidizing bacteria as *Vibrio extrorquens*.

- J. Bacteriol.* **88**, 106.
19. Takada, N., H. Sawada, Y. Amano and G. Terui. 1972. Abstracts 4th International Fermentation Symposium. p 19-25, March Kyoto.
 20. Troll, W. and R.K. Cannon. 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino acid and imino acids. *J. Biol. Chem.* **200**, 803-811.
 21. Whittenbury, R., K.C. Phillips and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **61**, 205.