

알칼리성 아밀라아제를 생산하는 *Bacillus*속 미생물의 분리와 그 조효소의 특성

신용철 · 김태운* · 이상열** · 변시명***

경상대학교 미생물학과, *지산간호보건전문대학 임상병리과
경상대학교 생화학과, *한국과학기술원 생물공학과

Isolation of Alkaline Amylase-Producing *Bacillus* sp. and Some Properties of Its Crude Enzyme

Yong Chul Shin, Tae Un Kim*, Sang Yeol Lee** and Si Myung Byun***

Department of Microbiology, Gyeongsang National University

*Department of Clinical Pathology, Jisan Junior College

**Department of Biochemistry, Gyeongsang National University

***Department of Biological Science and Technology, Korea Advanced Institute of Science and Technology

Abstract

An alkaline amylase-producing *Bacillus* sp. GM8901 was isolated and some properties of crude enzyme extract were examined. The microbiological and biochemical characteristics of GM8901 were very similar to those of *B. licheniformis*. The optimal temperature and pH for the cell growth and amylase production were 50°C and pH 10.5. The crude amylase extract showed that the optimal temperature and pH were 50~60°C and pH 10~12, respectively, and that the activity of amylase was stable up to 50°C and in the range of pH 3~12.

Key words: alkaline amylase, alkalophilic *Bacillus* sp., enzyme properties

서 론

전분을 분해하는 알파 아밀라아제가 동물, 식물에서 발견된 이래로 미생물이 생산하는 알파 아밀라아제에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다. 일반적으로 미생물 유래의 알파 아밀라아제는 동, 식물의 것보다 열안정성이 높아 오늘날 산업적으로 중요하게 사용되어지고 있다. 내열성 알파 아밀라아제를 분비하는 미생물로는 *Bacillus* sp.들이 잘 알려져 있다. *B. stearothermophilus*는 분자량이 53 kilodalton(kD)인 알파 아밀라아제를 분비하는데 이 효소는 최적 온도가 55°C, 최적 pH가 5~6인 중성의 내열성 효소인 것으로 보고되었다^{1,5,6)}. *B. licheniformis*의 경우는 분자량이 55.2 kD인 알파 아밀라아제를 생산하는데 이 효소는 최적 온도가 76°C, 최적 pH가 5~8 이고 특히 이 효소는 pH 7.0~11.0 범위에서 안정성을 보여 열안정성과 더불어 pH 안정성이 높은 것이 특징이었다^{2, 4)}. 이외에도 *B. coagulans*⁹⁾, *B. amyloliquefaciens*¹⁰⁾ 등이 분비하는 알파 아밀라아제도 열안정성이 높은 것으로 보고되었으며 이 효소들의 최적 pH는 중

성부근인 것으로 나타났다. 이들과는 달리 화산 온천에서 분리한 *B. acidocaldarius*가 생산하는 알파 아밀라아제는 분자량이 68 kD이고 최적 온도가 75°C, 최적 pH가 3.5 로써 내열성인 동시에 산성에서 최적 작용 pH를 갖는 특성을 가진 것으로 보고되었다¹¹⁾.

Bacillus sp.가 생산하는 알파 아밀라아제로서 작용 pH가 알칼리성인 효소들에 대해서는 별로 많이 연구되지 않은 편인데 1971년 Horikoshi¹²⁾에 의해서 처음으로 알칼리성 아밀라아제가 보고되었고 다음으로 Boyer 등¹³⁾이 *Bacillus* sp. NRRL B-3881 유래의 것을 보고하였다. 이들 *Bacillus* sp.들은 최적 작용 pH가 9.2~10.5 사이에 있는 알칼리성 효소이기는 하지만 좁은 pH 범위에서 효소활성을 가지며 40°C 이상에서 빠른 속도로 실활되어 pH 안정성이 낮은 것으로 보고되었다.

본 연구실에서는 무증자전분을 알칼리로 처리하는 경우 호화가 일어나며 이것을 중화한 후 알파 아밀라아제와 글루코 아밀라아제로 처리하게 되면 증자전분과 동일한 당화율을 얻을 수 있었다. 또한 이 당화액을 이용하여 알코올 발효를 하는 경우 증자전분과 비슷한 수율로 알코올을 얻을 수 있었다¹⁴⁾. 그러나 알칼리로 호화하는 경우 점도의 증가로 인하여 중화하기 어려운 점이 문제로 남아있다. 본 연구실에서는 이러한 문제를 해결하기 위한 일환으로써 높은 pH에서 활성을 갖는 아밀라아제를 분

Corresponding author: Yong Chul Shin, Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

리하여 알칼리로 호화된 전분을 액화시켜 보고자 시도 하였다. 최근에 본 연구실에서 내열성이면서 최적 pH가 pH 10~12인 아밀라아제를 분비하는 *Bacillus* sp.를 자연계에서 분리하여 분리균주의 특성과 조효소의 일반적 성질을 연구하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

알칼리성 아밀라아제 분비 미생물의 분리

알칼리성 아밀라아제를 분비하는 미생물을 자연계에서 분리하기 위해서 전국에서 폐수와 토양시료를 채취하였다. 미생물 분리에 사용한 시료는 경상북도 27점, 강원도 16점, 충청북도 25점, 충청남도 10점, 전라북도 5점, 전라남도 8점, 경상남도 9점으로서 총 100점이었다. 시료 1g 혹은 1 ml를 멸균수 10 ml에 현탁시킨 후 100 μ l ALS 한천배지(pH 10.5)에 고루 도말하고 37°C에서 48시간 배양하여 콜로니를 형성한 후 대표적인 콜로니를 ALS 사면배지에 transfer하였다. 사면배지에서 48시간 배양한 분리균주는 효소활성을 측정할 때까지 4°C 냉장고에 보관하였다. 여기서 사용한 ALS 배지의 조성은 soluble starch 1.0%, peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, Na_2CO_3 1.1%, Bacto agar 2.0%였다.

분리균주의 배양과 알칼리성 아밀라아제 활성비교

4°C에 보관한 분리균주를 5 ml ALS 액체배지가 든 cap tube에 접종하여 37°C 진탕배양기에서 24시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 미생물의 성장정도로 나타내었으며 효소활성을 측정하기 위해서 배양액을 7000 rpm에서 5분 원심분리하여 상등액을 모아 아밀라아제 활성을 측정하였다. 아밀라아제 효소활성은 Fuwa 등⁽¹⁵⁾의 방법을 약간 수정하여 사용하였는데 1.0% Soluble starch (50 mM Glycine-NaOH Buffer, pH 10.5) 1 ml를 37°C에서 5분간 preincubation한 후 효소액 100 μ l를 첨가하고 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 2 M acetic acid 200 μ l를 넣고 100°C에서 2분간 가열한 후 효소반응액 200 μ l를 2 ml의 KI-I₂ 용액(0.005% I₂+0.05% KI)에 넣고 잘 섞은 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 감소 정도를 비교하여 분리균주의 아밀라아제 활성을 비교하였다. KI-I₂ 용액을 이용한 효소활성 측정으로 선별된 균주는 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 환원당 정량법⁽¹⁶⁾을 이용하여 전분분해능을 재비교하여 우수한 균주를 선별하였다. DNS 방법을 이용한 효소활성은 1% Soluble starch(50 mM Glycine-NaOH Buffer, pH 10.5) 1 ml를 5분 동안 preincubation 후 효소액 200 μ l를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응한 다음 반응액 300 μ l를 1 ml DNS 용액에 넣고 끓는 물에서 5분 가열하여 식힌 후 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 heat-killed enzyme를 control로서 사용하여 550 nm에서 흡

광도의 증가로써 아밀라아제 활성을 비교하였다. 아밀라아제 효소 단위(unit)는 위의 조건하에서 1분 동안에 생성되는 환원당 양을 포도당으로 환산하였을 때의 μ mole 수로써 정의하였다.

분리균주의 동정

알칼리성 효소활성이 높은 GM8901 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁽¹⁷⁾의 분류방법에 따라 동정하였다.

조효소액의 제조

분리균주를 100 ml ALS 액체배지에 접종하여 50°C에서 150 rpm으로 48시간 배양한 배양액을 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 모으고 여기에 3배 부피의 에탄올을 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 단백질을 침전물을 원심분리하여 모으고 에탄올을 제거한 후 10 ml 증류수에 용해시켜 조효소액으로 하였다.

결과 및 고찰

호알칼리성 미생물의 분리와 시료별 분포비교

전국 100곳의 토양 또는 하천수를 채취하여 pH 10.5 ALS 한천배지에서 배양한 후 colony수를 측정해 본 결과 시료에 따라서 약 $6 \times 10^2 \sim 6 \times 10^5$ colonies/g의 호알칼리성 미생물 분포를 보였다. 일반적으로 밭토양, 산토양, 논토양 등은 지역에 따라 다소 차이가 있기는 하지만 약 10^4 colonies/g 수준을 보였다. 특히 호알칼리성 미생물이 많이 발견되는 시료로서는 염색공단의 공장 폐수와 두엄토양에서 6×10^5 colonies/g의 높은 분포를 보여 주었다. 한 가지 시료에 대하여 대표적인 2~5개의 colony를 수집하여 총 295 colony들을 ALS 사면배지에 옮겨 배양한 후 4°C에 보관하면서 KI-I₂법으로 아밀라아제 활성을 조사하였는데 그 중에서 GM8901로 명명된 균주가 pH 10.5에서 가장 높은 아밀라아제 활성을 보였다.

분리균주의 동정

pH 10.5에서 가장 아밀라아제 활성이 높은 GM8901 균주는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 그림양성의 간균으로서 endospore를 형성하였으며 감자 전분배지에서 아밀라아제를 분비하여 clear zone을 형성하였다. GM8901의 동정은 Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1986)의 방법에 따라서 수행하였으며 결과는 Table 1과 같다. 분리균주인 GM8901은 전분분해능 이외에도 casein과 gelatine을 분해할 수 있어 protease 활성이 높은 균주였으며 조사한 바에 따르면 이 protease는 pH 12 부근에서 최적 pH를 갖는 alkaline protease인 것으로 나타났다. 그리고 NaCl 농도가 7%까지는 잘 자랐으며 10%에서도 성장할 수 있었으나 좋지는 않았다. 생육은

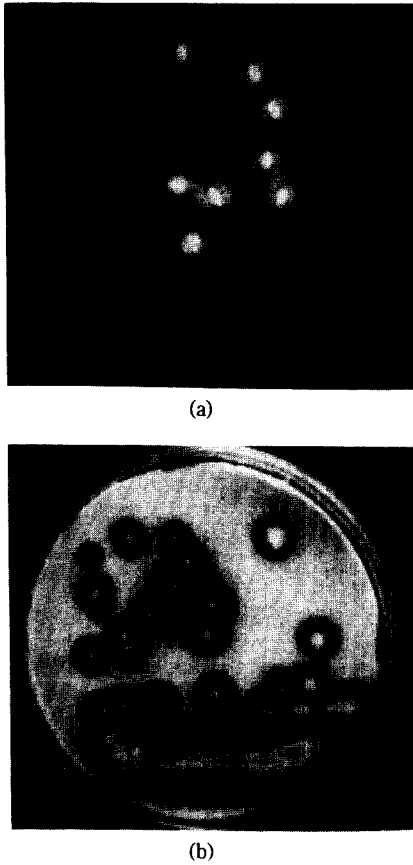


Fig. 1. Morphology and starch hydrolytic activity of strain GM 8901 on ALS agar plate (pH 10.5)

(a) Morphological observation of strain GM 8901 with phase contrast microscope, (b) starch hydrolytic activity on ALS agar plate

도는 조사한 30~50°C 범위에는 잘 자랐으며 초기 pH가 5.0 이하일 때는 전혀 성장하지 않았고, 초기 pH가 5.03, 6.21, 10.90일 때에는 12시간 정도의 lag-time이 지난 후 성장하기 시작하였으며, 초기 pH 7.40~10.5 사이에서는 잘 성장하였다. Table 1에 요약한 바와 같이 분리균주의 특성들은 *Bacillus licheniformis*와 유사한 것으로 나타났으며 이것을 *Bacillus* sp. GM8901로 명명하였다.

초기 pH에 따른 *Bacillus* sp. GM8901 성장과 효소 생산

Bacillus sp. GM8901의 초기 pH의 변화에 따른 성장과 효소생산을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에 나타내지 않았지만 초기 pH 4.44에서는 전혀 자라지 못하였고 초기 pH가 5.03, 6.21일 때는 12시간의 lag-time이 지난 후에 성장하기 시작하였다. 특히 초기 pH가 10.90인 경우 24시간 이후부터 성장하기 시작하였다. *Bacillus* sp. GM8901은 초기 pH가 6.21, 7.40, 8.42, 9.04, 9.91인 ALS

Table 1. Characteristics of strain GM 8901

Cell shape	Rod	Formation of	
Spore	+	indole	+
Gram stain	+	Growth at pH	
Catalase	+	6.8, nutrient broth	+
Voges-Proskauer test	+	5.7, nutrient broth	+
pH in V-P broth		Growth in NaCl	
<6	+	2%	+
>6	-	5%	+
Acid from		7%	+
D-Glucose	+	10%	+/-
L-Arabinose	+	Growth at(°C)	
D-Xylose	+	30	+
D-Mannitol	+	40	+
Gas from glucose	-	50	+
Hydrolysis of			
Casein	+		
Gelatin	+		
Starch	+		

+: Positive response, -: negative response, +/-: poor positive response

액배지에서 잘 자랐으나 배지의 초기 pH가 증가할수록 성장속도가 빠른 것을 알 수 있었다. 알칼리성 아밀라아제는 초기 pH가 9.04 이하에서는 효소활성이 배양액 1 ml당 0.22 unit 이하로 효소생산성이 낮았으나 초기 pH가 9.91, 10.90인 경우에는 배양액 1 ml당 각각 0.55, 0.88 unit로 효소생산성이 높았다. 따라서 *Bacillus* sp. GM8901은 중성 부근과 알칼리성 배지에서 자랄 수 있으나 알칼리쪽에서 최적 성장 pH를 갖는 호알칼리성 세균으로 보이며, 효소생산도 초기 pH가 높을수록 그 생산량이 증가되는 것으로 나타났다. 초기 pH를 달리 하고 *Bacillus* sp. GM8901을 접종하고 배양하였을 때 배양 후 배지의 pH가 변하였는데 초기 pH가 5.03, 7.40, 9.04, 9.91, 10.90인 경우 3일 배양 후 각각 7.46, 7.35, 8.42, 8.90, 9.14로 되었다.

***Bacillus* sp. GM8901의 온도에 따른 성장과 효소생산**

온도가 *Bacillus* sp. GM8901의 성장과 효소생산에 미치는 영향을 알아보기 위해서 30, 37, 50°C에서 150 rpm으로 48시간 배양한 다음 균의 성장과 효소의 활성을 측정하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 균체 성장과 효소활성이 50°C에서 가장 높은 것으로 나타났다. 이것으로 보아 *Bacillus* sp. GM8901 균주는 비교적 호열성 미생물로 사료되며 효소생산을 높이기 위해서는 온도를 50°C로 높이는 것이 좋은 것으로 생각된다.

가용성 전분에 의한 알칼리성 아밀라아제의 유도

Bacillus sp. GM8901이 세포 밖으로 분비하는 알칼리성 아밀라아제가 constitutive enzyme인지 inducible enzyme인지를 알아보기 위해서 가용성 전분을 넣은 ALS 배지와 가용성 전분 대신에 포도당을 넣은 ALG

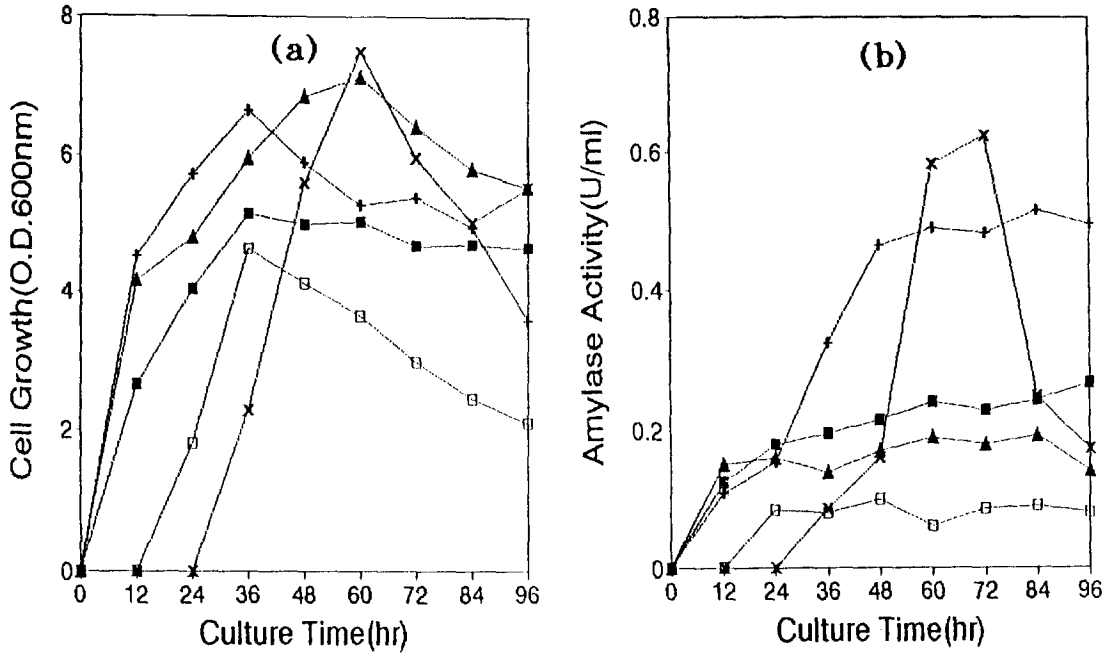


Fig. 2. Effect of pH on the cell growth and production of alkaline amylase of *Bacillus* sp. GM 8901
Bacillus sp. GM 8901 was cultivated at initial pH 5.03(□), 7.40(■), 9.04(▲), 9.91(+), and 10.90(×). (a) Cell growth, (b) amylase activity

Table 2. Effect of culture temperature on the cell growth and production of alkaline amylase of *Bacillus* sp. GM 8901

Temperature (°C)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Amylase activity (U/ml)
30	4.31	0.40
37	4.90	0.47
50	5.71	0.90

Table 3. Induction of alkaline amylase from *Bacillus* sp. GM 8901

Carbon source	Cell growth (OD ₆₀₀)	Amylase activity (U/ml)
Glucose	1.610	0.033
Soluble starch	1.945	0.500

배지를 이용하여 조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 포도당을 탄소원으로 사용한 경우 0.033 U/ml, 가용성 전분을 탄소원으로 사용한 경우 0.500 U/ml의 알칼리성 아밀라아제 효소를 생산하였다. 이 결과로부터 *Bacillus* sp. GM8901이 분비하는 알칼리성 아밀라아제는 inducible enzyme인 것을 알 수 있었다.

조효소의 특성

Bacillus sp. GM8901이 생성하는 알칼리성 아밀라아

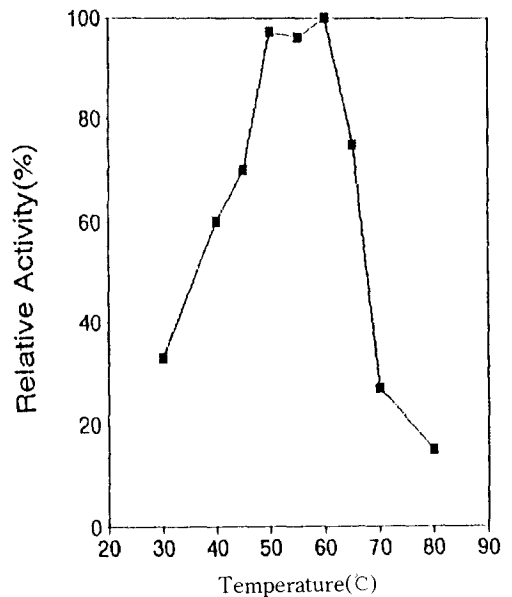


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of alkaline amylase

제를 3배 부피의 에탄올로 농축시킨 조효소액을 이용하여 여러 가지 특성을 살펴보았다. Fig.3에서 보는 바와 같이 이 효소의 최적 온도는 50~60°C 범위에서 나타나 비교적 고온성 효소인 것으로 판단된다. 효소의 열안정

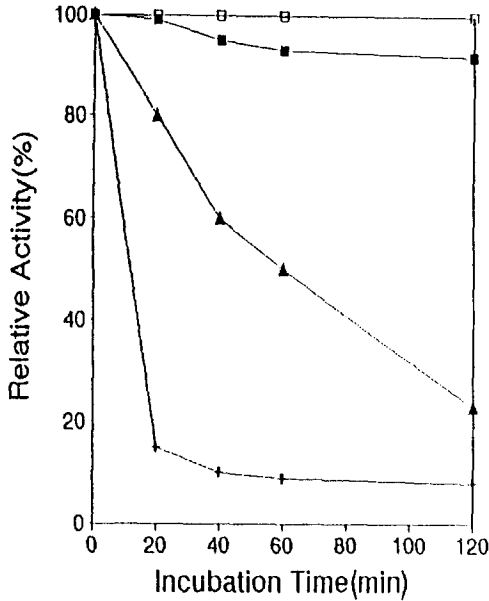


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of alkaline amylase

Enzymes were incubated at 30°C and 40°C(□), 50°C(■), 60°C(▲), and 70°C(+)

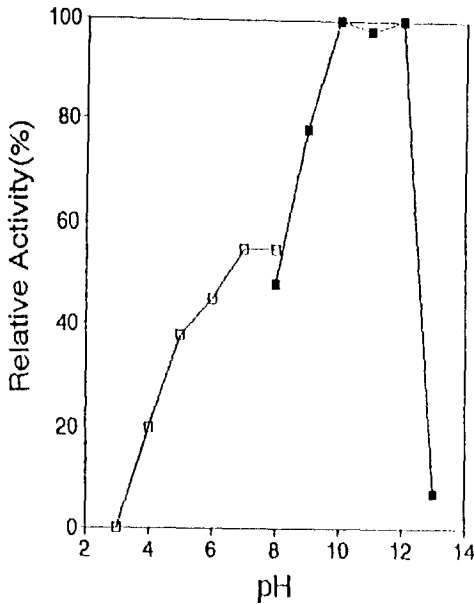


Fig. 5. Effect of pH on the activity of alkaline amylase

Citrate-sodium phosphate buffer(□), glycine-NaOH buffer(■)

성을 살펴보기 위해서 여러 가지 온도에서 효소를 incubation한 다음 시간별로 효소를 꺼내어 효소활성을 측정해 보았다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 30, 40°C에서

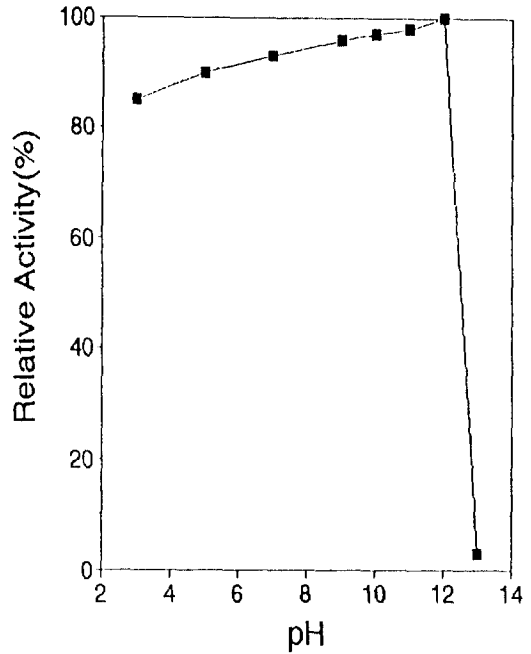


Fig. 6. Effect of pH on the stability of alkaline amylase

Enzyme solution was incubated for 1 hr at 37°C in each buffer solution

2시간까지 처리해도 초기 효소활성이 100% 유지되었고 50°C에서 2시간 처리하는 경우 초기 효소활성의 90%가 남아있어 비교적 열에 안정한 효소로 사료되었다. 그러나 60, 70°C로 처리하는 경우 2시간 후 각각 초기 효소활성의 20%, 8%로 떨어져 60°C 이상에서는 효소의 안정성이 크게 떨어지는 것으로 보인다. pH가 *Bacillus* sp. GM 8901이 분비하는 아밀라아제의 활성에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 50 mM citrate-NaH₂PO₄ 완충용액과 50 mM glycine-NaOH 완충용액을 이용하여 효소의 상대적 활성도를 조사하여 보았다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 효소의 최적 pH는 10.0~12.0 범위로 나타났으며 pH 3.0과 pH 13.0에서는 효소활성이 최적 pH에서의 효소활성에 비해서 각각 0%와 6.6%를 나타내 이런 pH에서는 거의 효소활성이 없는 것으로 보인다. 효소의 pH에 대한 안정성을 살펴보기 위해서 여러 가지 pH의 1 mM 완충용액에 효소를 넣고 37°C에서 1시간 incubation한 다음 효소활성을 측정해 보았다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 pH 12.0에서 가장 안정한 것으로 나타났으며 pH 3.0~11.0 범위에서는 pH 12.0에 비해서 90% 정도의 효소안정성을 보여 이 효소는 pH 3에서 pH 12까지 비교적 안정한 효소로 사료되었다. 그러나 pH 13.0에서 1시간 incubation하는 경우 효소활성이 2.5%로 떨어져 이 pH에서는 급격한 효소의 실활이 일어나는 것으로 생각된다.

본 연구실에서 *Bacillus* sp. GM8901 균주로부터 알

칼리성 아밀라아제의 분리 정제 연구를 수행하고 있으며 이 알칼리성 아밀라아제는 산업적으로는 고온, 높은 pH에서 전분을 분해하는 공정에 유용하게 응용될 수 있을 것으로 생각되며, 학문적으로는 *Bacillus*속이 분비하는 아밀라아제를 서로 비교 검토하므로써 단백질이 열안정을 갖는 메카니즘과 극한 pH에서 안정성을 갖게 되는 메카니즘을 밝히는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 보인다.

요 약

자연체로부터 알칼리성 아밀라아제 활성이 높은 *Bacillus* sp. GM8901 균주를 분리하여 균을 동정하였으며 그 조효소액을 이용하여 알칼리성 아밀라아제의 몇 가지 성질을 조사하였다. *Bacillus* sp. GM8901 균주의 특성을 조사해본 결과 *B. licheniformis*와 비슷한 것으로 나타났으며 50°C에서 균의 성장과 효소생산이 최대였으며 알칼리성 아밀라아제는 inducible 효소였다. *Bacillus* sp. GM8901 은 pH 10.5 부근에서 가장 잘 자라는 호알칼리성 균주였으며 효소생산도 최대치를 나타내었다. 조효소액을 이용하여 실험한 결과 알칼리성 아밀라아제의 최적온도는 50~60°C, 최적 pH는 pH 10~12였으며 비교적 50°C까지 열에 안정하였고 pH 3~12까지 효소의 안정성이 유지되는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 동자부 대체에너지 개발사업기금의 지원 (1989~1991)으로 이루어진 것으로 지원당국에 감사드리는 바입니다.

문 헌

1. Pfueller, S.L. and Elliott, W.H.: The extracellular α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.*, **244**, 48(1969)
2. Saito, N.: A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 290(1973)
3. Yuuki, T., Nomura, T., Tezuka, H., Tsuboi, A., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S.: Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α -amylase of *Bacillus licheniformis*: comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying α -amylase deduced from the DNA sequences. *J.*

- Biochem.*, **98**, 1147(1985)
4. Kim, I.C., Jang, S.Y., Cha, J.H., Ko, Y.H., Park, K.H. and Rho, H.M.: Cloning and expression of thermostable alpha-amylase gene in *Escherichia coli* from *Bacillus licheniformis* ATCC 27811. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **16**, 369(1988)
5. Ihara, H., Sasaki, T., Yamagata, H., Tsukagoshi, N. and Udaka, S.: Complete nucleotide sequence of a thermophilic α -amylase gene: homology between prokaryotic and eukaryotic α -amylases at the active sites. *J. Biochem.*, **98**, 95(1985)
6. Nakajima, R., Imanaka, T. and Aba, S.: Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 355(1986)
7. Yamane, K. and Maruo, B.: Properties of thermosensitive extracellular α -amylases of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **120**, 792(1974)
8. Yamaguchi, K., Nagata, Y. and Maruo, B.: Isolation of mutants defective in α -amylase from *Bacillus subtilis*: genetic analysis. *J. Bacteriol.*, **119**, 416(1974)
9. Cornelis, P., Digneffe, C. and Willemot, K.: Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 507(1982)
10. Takkinen, K., Pettersson, R.F., Kalkkinen, N., Palva, I., Soderlund, H. and Kaariainen, L.: Amino acid sequence of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1007(1983)
11. Buonocore, V., Caporade, C., Rossa, M.D. and Gambacorta, A.: Stable, inducible thermoacidophilic α -amylase from *Bacillus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.*, **128**, 515(1976)
12. Horikoshi, K.: Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1783(1971)
13. Boyer, E.W. and Ingle, M.B.: Extracellular alkaline amylase from a *Bacillus* species. *J. Bacteriol.*, **110**, 992(1972)
14. Shin, Y.C., Lee, S.Y., Choe, Y.K., Kim, H.S. and Byun, S.M.: Ethanol fermentation of cassava starch pretreated with alkali. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 627(1986)
15. Fuwa, H.: A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as substrate. *J. Biochem.*, **41**, 583(1954)
16. Miller, G.L.: Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959)
17. Sneath, P.H.: Endospore-forming gram-positive rods and cocci. in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. John, G.H.(ed), Williams and Wilkins, Baltimore, Vol.2. p.1104(1986)

(1991년 4월 1일 접수)