

Trichosporon Cutaneum 의 Lipase 에 관한 研究

第 1 報 Lipase 生産菌의 分離 및 同定

金 聖 烈

忠南大學校 農科大學

(1972. 11. 15 수리)

Studies on the Lipase of *Trichosporon cutaneum*

Part 1. Isolation and Identification of Lypolytic Microorganisms.

Seung Yul Kim

(Agricultural College of Choongnam National University)

(Received November 15, 1972)

Summary

(1) A potent lypolytic strain was selected by an extensive screening test of microorganisms isolated from air and various soils on the medium containing olive oil as sole source of carbon.

(2) Morphological and physiological characteristics of the selected strain had been investigated, and it has been identified to *Trichosporon cutaneum* in the manual of LODDER.

緒 論

Lipase 에 관한 研究는 오래前부터 試圖되어 왔으나 Amylase, Protease 등의 그것에 比하여 落後되어 있다. 그 理由로서는 첫째 이 酵素의 供給源이 動物臟器나 植物種子로 限定되어 있었고 둘째 Lipase 의 基質인 油脂가 물에 不溶性이기 때문에 反應이 不均一系에서 이루어진 다거나 研究에 使用한 基質의 組成이 明確하지 못했다는點 세째 이 酵素가 特히 不安定하여 精製가 困難하였으므로 不純한 標品을 使用한 研究가 많았다는點등을 들수 있다. 그러나 1950年代에 와서 酵素의 分離精製技術의 發達과 더불어 微生物을 利用하여 Lipase 를 工業적으로 生産해 보고져하는 研究가 試圖되면서 工業化에 成功한 例도 있고 高度로 純화된 酵素 또는 結晶酵素도 얻을수 있게되어 Lipase 에 관한

많은 問題들이 解決되어 가고 있다. 微生物 Lipase 中 食品의 變質에 關與하는 微生物이 生産하는 Lipase 에 관한 研究로서는 牛乳 및 乳製品의 變質과 關係되는 乳酸菌 *Pseudomonas* 屬, *Geotrichum* 屬, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Escherichia* 및 *Aerobacter* 등이 生産하는 Lipase 에 관한 Richard⁽¹⁾ 등, Cutchins⁽²⁾ 등, Nashif⁽³⁻⁵⁾ 등, Wilcox⁽⁶⁾ 등, Witter⁽⁷⁾, Alford^(8,9) 등, Pinheiro⁽¹⁰⁾ 등, Smith⁽¹¹⁾ 등, Oterholm⁽¹²⁾, Lu^(13,14) 등의 研究, egg york 의 汚染과 關係되는 *Staphylococcus* 屬菌이 生産하는 Lipase 에 관한 Gillespie⁽¹⁵⁾ 등, Shah⁽¹⁶⁾ 등, Vadehra⁽¹⁷⁾ 등의 研究 및 肉類와 肉製品의 腐敗 또는 變質과 關係되는 細菌이 生産하는 Lipase 에 관한 Alford⁽¹⁸⁾ 등, Collins-Thompson⁽¹⁹⁾ 등의 研究가 있으며 微生物 Lipase 의 工業적인 生産을 目的으로 한 研究로서는 松村⁽²⁰⁾ 의 *Rhizopus* 屬

lipase, 里村⁽²¹⁾의 *Sclerotinia libertiana* lipase, 山田⁽²²⁻³³⁾ 등의 *Candida cylindracea* lipase 및 *Candida paralipolytica* lipase, 岩井⁽³⁴⁻³⁶⁾ 등의 *Rhizopus delemar* lipase 에 관한 研究등을 들수있다.

한편 微生物 Lipase 의 性質에 관한 研究中에는 *Mycotorula lipolytica*^(37,38), *Aspergillus flavus*^(39,40), *Aspergillus luchuensis*⁽⁴¹⁾, *Sclerotinia libertiana*⁽²¹⁾, *Geotrichum candidum*⁽⁴²⁾, *Candida lipolytica*⁽⁶⁾, *Fusarium lini* Bolley⁽⁴³⁾, *Fusarium Vasinfectum*⁽⁴⁴⁾, *Penicillium roqueforti*^(45,46) *Penicillium Chrysogenum*⁽⁴⁷⁾, *Penicillium oxalicum*⁽⁴⁸⁾ 등이 生産하는 Crude lipase에 관한 研究가 있으나 이들 粗酵素의 性質에는 애매한點이 많으며 最近에 報告되고있는 精製酵素의 그것과는 比較하기 困難한것으로 認定 되고있다. 高度로精製한 微生物 Lipase 의 性質에 관한 研究로서는 松村⁽²⁰⁾의 *Rhizopus* 屬 lipase, 福本 등의⁽⁴⁹⁻⁵³⁾ *Aspergillus niger* lipase, 岩井^(34-36,54) 등 및 Fukumoto^(55,56) 등의 *Rhizopus delemar* lipase, Shah⁽¹⁶⁾ 등의 *Staphylococcus aureus* lipase, Tomizuka⁽⁵⁷⁾ 등의 *Candida cylindracea* lipase, Laboureur⁽⁵⁸⁾ 등의 *Rhizopus arrizus* lipase, Lu^(13,14) 등의 *Pseudomonas fragi* lipase, Ota⁽⁵⁹⁾ 등의 *Candida paralipolytica* lipase, Oterholm⁽⁶⁰⁾ 등의 *Propionibacterium Shermanii* lipase, 및 Troller⁽⁶¹⁾ 등의 *Staphylococcus* 屬 lipase에 관한 研究가 있다.

以上の 報告를 檢討해보면 微生物 lipase 는 그 給源에 따라 蛋白構造, 基質特異性, 作用機作 其他 酵素學의 特性이 多種多樣 하다는것을 알수있으므로 더욱 많은 研究를 必要로 하고있다.

筆者는 微生物 lipase의 工業的인 生産을 爲한 基礎 研究를 目的으로 自然界로부터 300餘株의 Lipase 生産菌을 分離하였으며 이들의 酵素生産能을 檢討하여 Lipase生産力이 特히 강한 1菌株를 選擇하게 되었으므로 그의 菌學的性質을 檢討하여 報告 하는 바이다.

實驗方法

1). Lipase 生産菌의 分離

(1). 分離源

強力한 Lipase生産菌을 分離하기 爲하여 一般土壤, 空氣, 污水外에 大田市一圓의 大小製油工場 内外部의 堆積土壤 및 下水溝에서 分離 하였다.

(2). 分離培地

olive oil을 唯一炭素源으로하는 山田⁽³¹⁾ 등의 Lipase 生産菌分離培地를 使用하였으며 그 組成을 보면

다음과 같다.

Table 1. Medium for isolation of lipolytic microorganisms.

Olive oil	2.0%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1
Agar	3.0

(3) 分離方法

上記培地를 120°C 15分間 殺菌한 다음 凝固되지 않을 程度로 冷却시키고 homogenizer (日本精機社製)를 使用하여 無菌的으로 2分間 乳化시킨것 10ml씩을 petri dish 에 分注하여 平板培地를 만들고 이것에 試料를 滅菌水에 懸濁한 液을 塗沫한다음 30°C 에서 2~3日間 培養하여 發育程度 및 colony 周圍에 形成되는 分解環의 크기에 따라 分離하였으며 空氣로부터의 分離는 petri dish 를 所定場所에서 10~20分間 뚜껑을 열었다가 닫은 後 上記한바와 같이 培養하여 分離하였다.

2) 菌株의 選定

(1) 選定培地

山田 등⁽³¹⁾의 Lipase 生産用培地를 使用하여 Screening 하였으며 그 組成은 Table 2에 表示한바와 같다.

Table 2. Medium for Lipase production.

Glucose	2.0%
Soybean meal	2.0
Olive oil	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
CaCO ₃	0.5

(2) 選定方法

Table 2의 液體培地를 500ml 容振盪 flask 에 50 ml씩 分注하여 115°C 에서 15分間 殺菌한 다음 malt agar 또는 nutrient broth agar 에 2日間 前培養한 分離菌株들로부터 菌體 一白金耳量을 接種하여 30°C 에서 3日間 振盪培養(110 oscill./min., stroke 5cm)하고 이것을 遠沈하여 菌體 其他를 除去한 清澄液을 酵素液으로 하여 그의 Lipase 力價를 測定 比較 하였다.

3) Lipase의 力價測定

Nord⁽⁶²⁾ 등의 Yamada 등 變法⁽⁶³⁾을 使用하여 測定 하였다.

試藥

- a) olive oil
- b) 0.1M-citrate phosphate buffer (pH 7.0)
- c) 0.05N-NaOH 水溶液
- d) 1% Phenolphthalein alcohol 溶液

(1) Olive oil 乳液의 調製

20g의 polyvinyl alcohol (PVA, Kurashiki Rayon Co.)을 1ℓ 蒸溜水에 懸濁시키고 攪拌하면서 徐徐히 加熱하여 80°C에 達하면 이溫度를 約 1時間 維持하도록 加熱을 繼續하여 PVA가 完全히 溶解되어 透明해지면 冷却, 濾過한다. 이 PVA 溶液 75ml와 25ml의 Olive oil (Sabater Esteve Co.)을 homogenizer (日本精機社製)의 内部容器에 넣고 外部容器에는 얼음을 채워 充分히 冷却시킨後 氷冷을 繼續하면서 20,000 r.p.m.으로 15分間 乳化시켜 使用하였다.

(2) 測定法

L字型 Monod 試驗管에 olive oil 乳液 5ml와 buffer solution 4ml를 넣어 shaking incubator 內에 세워놓고 37°C에 達할때까지 豫熱한다음 酵素液 1ml를 넣고 密栓하여 37°C에서 4時間 振盪(110 oscills./min. stroke 5cm)하면서 反應시킨다. 4時間後 alcohol acetone (1:1) 混液 20ml를 加하여 反應을 中止시키고 50ml容 erlenmeyer flask에 옮겨 phenolphthalein을 指示藥으로 하여 0.05N-NaOH 水溶液으로 遊離脂肪酸을 滴定하였다으며 blank로서는 熱湯中에서 10分間 加熱한 酵素液 1ml를 加하고 同一操作을 거쳐 滴定하였으며 兩測定值의 差로부터 Lipase의 活性을 求하였다.

4) 選定菌株의 形態的 및 生理的性質

(1) 細胞의 形態와 크기

Malt extract 및 YM 培地(yeast extract 3g, malt extract 3g, peptone 5g, glucose 10g, dist. water 1,000ml)를 使用하여 25°C에서 3日間 培養하여 鏡檢하였다.

(2) Colony의 形態와 構造

Malt agar 및 Malt gelatin plate에 17°C로 1個月間 培養하여 觀察하였다.

(3) Pellicle, Ring 및 Sediment의 形成

前記한 Malt extract 및 YM 培地에 25°C로 3~30日間 培養하면서 觀察하였다.

(4) Ascospore의 形成

Gorodokowa agar, V-8 juice agar 및 Acetate agar 등을 使用하여 25°C에서 1~3週間 培養하면서 鏡檢 하였다.

(5) Pseudomycelium 및 Arthrospore의 形成

Potato glucose agar를 使用하여 25°C에서 slide culture하여 5時間後부터 經時的으로 鏡檢 하였다.

(6) 糖類醱酵性

0.2% peptone 및 0.1% yeast extract를 含有하는 溶液에 2%의 各種糖類를 溶解한 培地를 Durham tube를 넣은 試驗管에 10ml씩 分注하여 115°C로 15分間 殺菌하여 氣泡가 없음을 確認한後 供試菌을 接種하여 25°C에서 1~2週間 培養하면서 觀察하였다.

(7) 炭素源의 資化性

YNB agar (yeast nitrogen base 0.11g, bacto agar 0.4g, dist. water 16ml) 16ml와 供試菌의 殺菌水懸濁液 4ml를 50°C 內외의 petri dish에서 無菌的으로 混和한 다음 25°C의 incubator 中에서 凝結水를 蒸發시키고 少量의 供試炭素源粉末을 無菌的으로 附着시키는 Auxanograph⁽⁶⁴⁾法 및 無糖基礎培地⁽⁶⁵⁾ 또는 YNB 液體培地를 115°C에서 15分間 殺菌한後 別途로 殺菌해놓은 3%의 炭素源液을 無菌的으로 添加하고 供試菌을 接種하는 方法을 使用하여 25°C에서 1週間 培養하면서 炭素源의 資化性을 檢討하였으며 control로서는 糖類를 添加하지 않은 同一培地를 使用하였다.

(8) Nitrate 資化性

YCB agar (yeast carbon base 3.5g, bacto agar 7.5g, dist. water 300ml) 16ml와 供試菌의 殺菌水懸濁液 4ml를 無菌的으로 混和한 다음 炭素源의 資化性實驗과 同一한 Auxanograph法을 適用하여 KNO₃ 및 NaNO₂ 粉末을 附着하여 培養하였으며 control로서는 (NH₄)₂SO₄를 使用하였다.

(9) 耐滲透壓性

Osmotic medium (glucose 50g, malt extract 3g, yeast extract 0.5g, agar 2.5g, dist. water 100ml) 10ml씩을 試驗管에 分注하여 121°C로 15分間 殺菌한다음 petri dish에 無菌的으로 옮긴것에 供試菌을 接種한後 25°C로 3~7日間 培養하면서 觀察하였다.

(10) Vitamin 要求性

Vitamin 要求性培地(Vitamin free base 1.7g, dist. water 100ml)를 試驗管에 10ml씩 分注하여 115°C로 15分間 殺菌한後 供試菌을 接種하여 25°C에서

3~7日間 培養하면서 觀察하였다.

結果 및 考察

(11) Starch 生産性

YNB agar 를 使用하여 Auxanograph 法으로 glucose 의 資化性을 檢討한後 形成된 colony 上에 iodine 溶液을 滴下하여 澱粉反應을 觀察하였다.

(12) 生育最高溫度의 測定

前記 YM agar slant 에 供試菌을 接種하여 30~45°C 에서 3日間 培養하여 生育可能性을 檢討 하였다.

1) 菌의 分離와 優秀菌株의 選定

前記 Table 1의 Lipase 生産菌分離培地를 使用하여 이들의 Lipase 生産能을 檢討한 바 Strain A-6 가 Lipase 生産能이 가장 強力하다고 認定되었으므로 以後 이菌株를 使用하여 實驗하였다.

2) 選定菌株(Strain A-6)의 同定

選定된 Strain A-6의 菌學的性質을 檢討한 結果는 Table 3에 表示한 바와 같다.

Table 3. Morphological and Physiological characteristics of the selected strain.

(1) Growth in glucose-yeast extract-malt extract medium:	
After 3 days at 25°C, cells are oval, long oval or elongate to cylindrical (3.6-11.6) × (4.8-15.2)μ, single, in pairs or in short chains. A thick, soft, white pellicle, smooth creeping pellicle is formed. After one month at 17°C, a sediment and a dull, coarsely wrinkled pellicle are present.	
(2) Growth on malt agar:	
After one month at 17°C, the streak culture is white colored, wrinkled, hairy, dull, dry, fringed with mycellium.	
(3) Slide culture on potato-glucose agar:	
True mycellium and arthrospores are abundant and pseudomycelium is often seen. The blastospores are usually arranged in chains and arise directly from the true hyphae in chains.	
(4) Fermentation:	
Glucose + (weak, latent), Galactose -, Sucrose -, Maltose -, Trehalose -, Lactose -, Raffinose -, Inulin -.	
(5) Assimilation of carbon compounds:	
Glucose +, Galactose +, L-Sorbose +, Sucrose +, Maltose +, Cellobiose +, Trehalose +, Lactose +, Melibiose +, Raffinose +, Melizitose -, Inulin -, Soluble starch +, D-Xylose +, L-Arabinose +, D-Arabinose +, D-Ribose, L-Rhamnose +, Ethanol +, Glycerol +, Erythritol +, Ribitol +, Galactitol +, D-Mannitol +, D-Glucitol +, L-Methyl-D-Glucoside +, Salicin +, DL-Lactic acid +, Succinic acid +, Citirc acid +, Inositol +.	
(6) Assimilation of nitrogen compounds:	
Potassium nitrate: - Sodium nitrite: -	
(7) Growth in vitamin-free medium:	Negative.
(8) Growth on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar:	Negative.
(9) Maximum temperature of growth:	33-35°C.
(10) Starch formation:	Negative.

本菌의 顯微鏡寫眞 및 Strain 의 形態를 Fig. 1~4에 表示하였다.

選定된 Strain A-6를 Lodder⁽⁶⁴⁾의 manual 에 依하여 同定한바 本菌에는 여러가지 形態의 budding

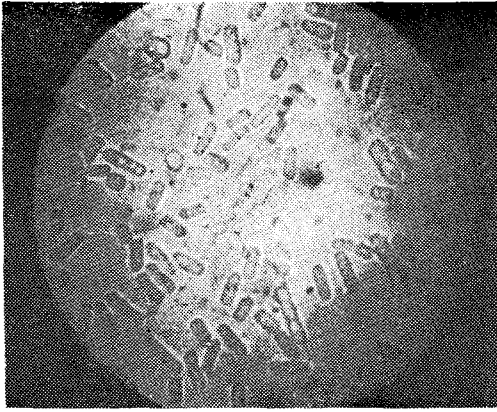


Fig. 1. Micrograph of the selected strain. Medium: Malt extract, 3 days at 25°C (× 600).

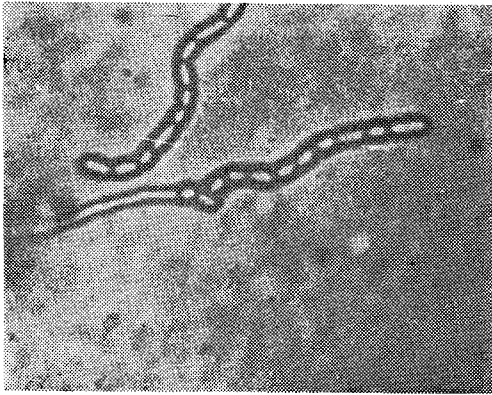


Fig. 2. Micro of blastospore and pseudomycelium of the selected strain. Medium: Potato glucose agar, 3 days at 25°C (×600).

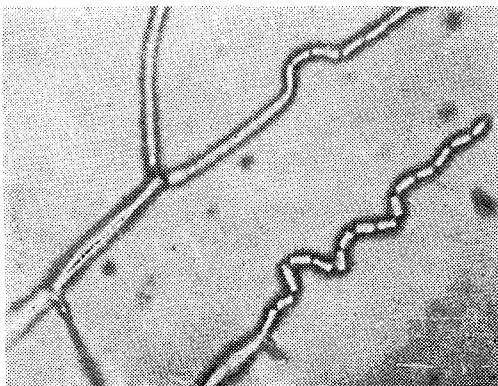


Fig. 3. Micrograph of arthrospore formation of the selected strain. Medium: Potato glucose agar, 3 days at 25°C (×600).

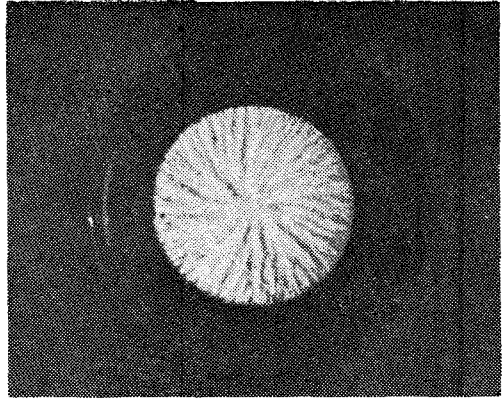


Fig. 4. Photograph of giant colony of the selected strain. Medium: Malt gelatin, one month, at 17°C.

cell 과 pseudomycelium, true mycelium, arthrospore 가 存在하며 ascospore 를 形成하지 않고, glucose 만을 微弱하게 醱酵하며 lactose 를 資化하고 nitrate 를 資化하지 못하며 Sarcina 와 같은 細胞群 이 存在하지 않으므로 *Trichosporon cutaneum* 에 屬하는 菌株로 認定되었다.

要 約

(1) Olive oil 을 唯一炭素源으로하는 培地를 使用하여 空氣 및 土壤中에서 300餘株의 Lipase 生産 菌을 分離하였으며 이들의 Lipase 生産能을 檢討하여 有用菌株 1株를 選定하였다.

(2) 選定된 菌株의 形態學的 및 生理學的의 性質을 檢討한바 Lodder manual 의 *Trichosporon cutaneum* 에 屬하는 菌株로 認定되었다.

끝으로 本研究遂行中 많은 資料를 送付해주신 Canada 의 朴鍾一博士任을 비롯하여 日本의 太田安英, 辻阪好夫兩博士任, 그리고 積極的인 指導를 아끼지않으신 서울大學校 農科大學 曹應鉉博士任과 李春寧博士任께 衷心으로 感謝를 드리는 바이다.

參 考 文 獻

1. Richards, T., and G.M. El-Sadek: J. Dairy Res., 16, 46(1949).
2. Cutchins, E.C., R.N. Doetsch, and M.J. Delczar: J. Bacteriol., 63, 269(1952).
3. Nashif, S.A., and F.E. Nelson: J. Dairy Sci., 36, 459(1953).
4. Nashif, S.A., and F.E. Nelson: Ibid., 36, 471

- (1953).
5. Nashif, S.A., F.E. Nelson: *J. Dairy Sci.*, **36**, 481(1953).
 6. Wilcox, C., W.O. Nelson, and W.A. Wood: *Ibid.*, **38**, 775(1955).
 7. Witter, L.D.: *Ibid.*, **44**, 983(1961).
 8. Alford, J.A., and D.A. Pierce: *J. Food Sci.*, **26**, 518(1961)
 9. Alford, J.A., and D.A., and D.A. Pierce: *J. Bacteriol.*, **86**, 24(1963).
 10. Pinheiro, A.J.R., B.J. Liska, and C.E. Parmdee: *J. Dairy Sci.*, **48**, 983(1965).
 11. Smith, J.L., and J.A. Alford: *Appl. Microbiol.*, **14**, 699(1966).
 12. Oterholm, A., Z.J. Ordal, and L.D. Witter: *Appl. Microbiol.*, **16**, 524(1968).
 13. Lu, J.Y., and B.J. Liska: *Appl. Microbiol.*, **18**, 104(1969).
 14. Lu, J.Y., and B.J. Liska: *Ibid.*, **18**, 108(1969).
 15. Gillespie, W.A., and V.G. Alder: *J. Pathol. Bacteriol.*, **64**, 187(1952).
 16. Shah, D.B., and J.B. Wilson: *J. Bacteriol.*, **89**, 949(1965).
 17. Vadehra, D.V., and L.G. Harmo: *Appl. Microbiol.*, **15**, 292(1967).
 18. Alford, J.A., D.A. Pierce and W.L. Sulzbacher: *Proc. 15th Conf, on Research, council on Research Amer. Meat Inst. Univ. of Chicago*, 11(1964).
 19. Collins-Thompson, D.L., T. Sorhaug, L.D. Witter, and Z. Ordal: *Appl. Microbiol.*, **21**, 9(1971).
 20. 松村親: *日醸協*, **20**, 278(1962)
 21. Satomura, Y., and J. Fukumoto: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **22**, 194(1958), **23**, 150(1959), **24**, 329(1960), **25**, 15(1961).
 22. 町田晴夫, 東俊彦, 山田浩一: *日醸協*, **22**, 427(1964).
 23. Ota, Y., S.Miyairi, and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1476(1968).
 24. Ota, Y., M. Suzuki and K. Yamada: *Ibid* **32**, 390 (1968).
 25. 太田安英 山田浩一: *日農化*, **37**, 653 (1963).
 26. Ota, Y., and K. Yamada: *Ibid.*, **30**, 351 (1966).
 27. Ota, Y., and K. Yamada: *Ibid*, **30**, 1030 (1966).
 28. Ota, Y., and K. Yamada: *Ibid*, **31**, 809 (1967).
 29. Takahashi, J., K. Kobayashi, Y. Kawabata, and K. Yamada: *Ibid*, **27**, 836 (1963).
 30. Tomizuka, N., Y. Ota, and K. Yamada: *Ibid* **30**, 1090(1966).
 31. 山田浩一, 町田晴夫: *日農化*, **36**, 858(1962).
 32. 山田浩一, 町田晴夫, 東俊彦, 小出章夫, 植田克子, *Ibid*, **37**, 645(1963)
 33. 山田浩一, 太田安英: *Ibid*, **37**, 645(1963).
 34. 岩井美枝子, 辻阪好夫, 福本壽一郎: 第15回酵化シンポジウム講演集 117(1963).
 35. 岩井美枝子, 辻阪好夫, 福本壽一郎: 第16回酵化シンポジウム講演集 235(1964).
 36. 岩井美枝子, 辻阪好夫, 板谷公和, 岡本精文, 福本壽一郁: *科學と工業*, **40**, 18(1966).
 37. Peters, I.I., and F.E. Nelson: *J. Bacteriol.*, **55**, 581(1948).
 38. Peters. I.I., and F.E. Nelson: *Ibid*, **55**, 593(1948).
 39. Natlor, N.M: *J. Sci.*, **4**, 464(1930).
 40. Weisbodt, L.L.: *Iowa State Coll. Libr. Ames*, 50(1927).
 41. Smith, C.V., and B.B. Drake: *U.S. Patent No. 2,480, 090*(1947).
 42. Nelson, W.O.: *J. Dairy Sci.*, **35**, 455(1952).
 43. Fiore, J.V., and E.F. Nord: *Arch. Biochem.*, **23**, 473(1949).
 44. Lakshminarayanan, F.: *Enzymologia*, **19**, 59(1958).
 45. Fordor, P.J., and A. Chari: *Enzymologia*, **13**, 258(1949).
 46. Thiboden, R., and H. Macy: *Minn. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.*, 152(1942).
 47. Ramakrishnnan, C.V., and B.N. Banerjee: *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 131(1952).
 48. Kirsh, D: *J. Biol. Chem.*, **108**, 421(1935).
 49. 福本壽一郎, 辻阪好夫: 第13回 酵化シンポジウム 講演集 149(1961).
 50. Fukumoto, J., M. Iwai, and Y. Tsujisaka: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**, 353(1953).
 51. Iwai, M., Y. Tsujisaka, and J. Fukumoto: *Ibid.*, **10**, 13(1964).

52. Iwai, M., Y. Tsujisaka, and J. Fukumoto: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 87(1964).
53. Iwai, M., Y. Tsujisaka, and J. Fukumoto: *Ibid.*, **16**, 81(1970).
54. 岩井美枝子, 辻阪好夫, 福本壽一郎: *日醸協* **22**, 419(1964).
55. 福本壽一郎, 岩井美枝子, 辻阪好夫 *科學と工業*, **38**, 373(1964).
56. Fukumoto, J., M. Iwai, and Y. Tsujisaka: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **9**, 353(1953).
57. Tomizuka, N., Y. Ota, and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 576(1966).
58. Laboureur, P., and M. Labrousse: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **48**, 747(1966).
59. Ota, Y., T. Nakamiya, and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1368(1970).
60. Oterholm, A., Z.J. Ordal, and L.D. Witter: *Appl. Microbiol.*, **20**, 16(1970).
61. Troller, J.A., and M.A. Bozeman: *Ibid.*, **20**, 480(1970).
62. Nord, F.F., and J.V. Fiore: *Arch. Biochem Biophys.*, **23**, 473(1949).
63. 山田浩一, 太田安英, 町田晴夫: *日農化*, **38**, 860(1962).
64. Lodder, J.: *The Yeasts, A Taxanomic Study* 459(1970).
65. 東京大學: *實驗農藝化學(上)*, 267(1960).