

“Biotin Vitamer 를 Growth Factor 로 使用時 L-Glutamic Acid 醱酵에 미치는 영향”

梁漢喆, 金燦一, 成河珍
高麗大學校 農科大學 食品工學科

“Studies on the Effect of Biotin Vitamers as a Growth Factors in the L-Glutamic Acid Fermentation”

Han Chul Yang, Hyuk Il Kim, Ha Chin Sung

Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University
(Received November 27, 1973)

Abstract

The effect of biotin and biotin vitamer on the fermentative production of L-glutamic acid (L-GA) by *Brevibacterium flavum* was studied. And results were as follows.

1) L-GA production in the medium containing 10% Glucose was the best at the concentration of Biotin 5 γ /l, Desthiobiotin 5 γ /l, and 7,8-Diaminopelargonic acid 10 γ /l, respectively.

2) In the experiment using the Glucose-Acetate mixed media divided into four parts, considerable amounts of cell growth and L-GA production were observed in the mixed medium containing 2% Glucose-Acetate.

3) In the cases of using the media containing methanol, ethanol, ethylacetate, acetic acid (free acetate), Na-acetate:NH₄-acetate=2:1, the production of L-GA were in decreasing order as follows; Na-Acetate:NH₄-Acetate=2:1 > Acetic acid (free acetate) > Ethylacetate > Ethanol > Methanol.

4) When biotin vitamers as growth factors were added in the medium containing Glucose or Acetate as the source of carbon, the substitution effect of Desthiobiotin was almost the same, 7,8-Diaminopelargonic acid 3 or 4 times stronger, and Biotin has no substitution effect, compared with Biotin.

I. 緒 論

L-glutamic acid 醱酵生産에서 Biotin 이 必須因子라는 것은 이미 많은 研究報告에^{1,2,3)} 依해서 잘 알려져 왔으나 本實驗에서는 Biotin 代替物質로서 Biotin vitamer 가 L-GA(L-glutamic acid)生成에 미치는 영향에 關하여 研究를하였다.

使用한 Biotin vitamer 로서는 dl-Desthiobiotin, 7,8-Diaminopelargonic acid, Biotin 등이다.

Desthiobiotin 은 D. B. Melville⁴⁾에 依하여 *Saccharomyces cerevisiae* 에서 Biotin 活性이 있다는것이 明白하여진 以來 各種의 Biotin 要求菌에서 活性이 있으나 *Lactobacillus casei*⁵⁾, *Lactobacillus arabinosus*⁶⁾에서는 活性이 없음을 報告 하였다. Okumura⁷⁾ 등은 Desthiobiotin 이 Biotin precursor의 作用을 가지고 있어 이 物質을 growth factor 로 첨가한 醱酵의 結果와 Biotin 을 growth factor 로 첨가한 醱酵의 結果가 거의 一致 하였기 때문에 Desthiobiotin이 細胞內에서 活潑히 Biotin 으로 變換하여

Biotin과 같은 生理作用을 나타낸다고 報告하였다.

한편 7.8-Diaminopelargonic acid는 D. B. Melville⁽⁶⁾이 *Sacch. cerevisiae*에서 Desthiobiotin의 1/10의 生育活性이 있음을 報告하였다.

K. Dittmer⁽⁹⁾ 등은 *Sacch. cerevisiae*에서 Biotin 활성을 100으로 하면 7.8-Diaminopelargonic acid에서는 10活性, *L. Casei*에서는, 0.001活性이 있다고 報告 하였다.

또한 E. L. Tatum⁽¹⁰⁾ 등은 *Neurospora crassa* 와 *E. coli* 變異株 58株에 對하여 研究한 結果 活性이 全部 0.01以下 였다고 報告하였다.

F. J. Ryan⁽¹¹⁾ 은 7,8-Diaminopelargonic acid 가 Pimelic acid와 Desthiobiotin의 中間體로 存在한다고 報告하였다.

Okumura^(12,13,14) 등은 7.8-Diaminopelargonic acid를 growth factor로 使用한 結果 L-GA 醱酵에서 Biotin이나 Desthiobiotin의 경우와 같이 거의 正常的인 醱酵을 나타냈으나 Biotin 5γ에 對하여 7.8-Diaminopelargonic acid는 15~20γ 정도가 必要하며 Desthiobiotin⁽⁶⁾은 Biotin과 거의 같은 量이 必要하다고 報告하였다.

Bisnorbiotin은 Biotin의 side chain을 β-oxidation시켜서 얻은 產物로 Yang^(15,16) 등은 *Endomycopsis. sp.* 培養液으로 부터 結晶狀態로 單離하였으며 Bisnorbiotin의 活性은 *Bacillus subtilis*에서는 Biotin에 對하여 100%의 活性이 나타났으나 *Sacch. cerevisiae*와 *L. arabinosus*에서는 거의 活性이 없다고 報告하였다.

지금까지 Carbon source로 glucose 또는 molasses를 利用한 培地에 있어서 growth factor로서 Biotin, Desthiobiotin, 7.8-Diaminopelargonic acid 등이 L-GA 生成에 미치는 影響에 關한 報文은 있으나 Bisnorbiotin을 growth factor로 使用하였을 때의 L-GA 生成에 미치는 影響에 關한 報文은 없으며 또한 Carbon source로 acetic acid^(17,18,19,20)를 使用하였을 때 Biotin vitamer가 L-GA 발효에 미치는 影響에 關한 報告가 없기 때문에 *Brevibacterium flavum*^(21,22,23)을 使用하여 Biotin, Desthiobiotin, 7.8-Diaminopelargonic acid와 Bisnorbiotin을 growth factor로 使用하여 Carbon source로 glucose 培地, glucose-acetate 混合培地 및 各種 有機化合物⁽²⁴⁾을 培地로 使用하였을 때 醱酵에 미치는 影響에 關하여 實驗한 結果를 報告한다.

II. 實驗方法

1. 使用菌株

Brevibacterium flavum.

Table 1. Composition of Slant Medium.

Beef extract	1.0%
Polypeptone	0.5%
NaCl	0.5%
Glucose	0.5%
Urea	0.5%
Agar	2.0%
pH	7.4

Table 1의 培地를 使用하여 30°C에서 24時間 斜面培養하여 保存菌으로 使用하였다.

2. 培地組成과 培養條件

本實驗에 使用한 培地組成은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of Basal Medium

*Carbon sources	
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04%
Fe ⁺⁺	2ppm
Mn ⁺⁺	2ppm
Casamino acid (Vitamin free)	0.05%
Riboflavin	200γ/l
Thiamin-HCl	200γ/l
P-aminobenzoic acid	200γ/l
Pyridoxal. HCl	20γ/l
Pyridoxine. HCl	100γ/l
Ca-pantothenate	100γ/l
Nicotinic acid	100γ/l
Folic acid	10γ/l
**Urea	0.9-2.8%
***Biotin Vitamer required amount	
pH	7.0

*A. glucose 10%

B. glucose 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%의 各 glucose 농도에 acetate를 混合하여 使用, Initial acetate : 1.0% (Na-acetate : NH₄-acetate=2:1) Added acetate (free acetate) : 12시간 후 2%, 24시간 후 3%, 36시간 후 4% feeding하여 Total acetate가 10%되게 하여 使用, pH control은 30%-NH₄OH soln을 使用하여 pH 7.8~8.0으로 調節하여 주었다.

C. Methanol, Ethanol, Ethylacetate, Acetic acid (free acetate), Na-acetate : NH₄-acetate=2:1의 各 有機化合物을 Initial 1%, 12시간 후 2%, 24시간 후 3%, 36시간 후 4% feeding하여서

Table 3. Chemical Structures of some Biotin Vitamers

Vitamer	Chemical Structure	Molecular Weight	Melting Point
d-Biotin	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HN} \quad \text{NH} \\ \quad \\ \text{HC} - \text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \end{array} $	244.3	230—232°C
dl-Desthiobiotin	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HN} \quad \text{NH} \\ \quad \\ \text{HC} - \text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{COOH} \end{array} $	212.24	156—158°C
7, 8-Diaminopelargonic acid	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{HC} - \text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{COOH} \end{array} $	188.3	135—139°C
Bisnorbiotin	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HN} \quad \text{NH} \\ \quad \\ \text{HC} - \text{CH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \end{array} $	218.3	213—216°C

Total 10% 되게 하였다.

** Initial 1%, 12시간후 0.9%, 24시간후 0.9% feeding 하여 total 2.8%되게 하였다.

*** 實驗結果에서 사용한 Biotin vitamer의 各濃度를 表示.

本 實驗에서 사용한 Biotin vitamer의 化學構造는 Table3과 같다.

殺菌方法은 混合殺菌과 分別殺菌이 있으나 本實驗에서 사용한 7.8-Diaminopelargonic acid가 glucose와 加熱反應이 나타나서 失活이 되기 때문에⁽¹⁴⁾ 分別殺菌을 하였다.

分別殺菌法은 Biotin vitamer를 다른 培地成分과 따로 희석액을 만들어서 殺菌하여 冷却시킨 다음 菌接種時에 그 희석액 適當量을 主培養 flask에 첨가 하는 方法이다.

이때의 殺菌條件은 500ml 培養 flask에 培養液을 30ml씩 分注하여 110°C에서 五分間 蒸氣殺菌하였다.

培養은 振幅 7cm, 120r. p. m, 30°C의 條件에서 왕복 진탕 培養을 行하였다.

3. Cell Growth 測定

Broth를 26배 희석하여서 Spectrophotometer를 使用해 562m μ 에서 optical density로서 측정하였다. (Shimadzu model OV-50 spectrophotometer 使用)

4. L-GA 定量^(25,26)

Paper chromatography 方法을 改良한 定量法을 使用하였다.

Broth를 9,000 r. p. m에서 약 10分間 遠心分離하고 適當히 희석하여 Toyo chromatography filter paper (No. 50)에 길이 2cm, 幅 0.5cm로 0.1ml씩 spot한 다음 n-butanol: Acetic acid: water=4:1:5의 混液의 上層을 取하여서 展開劑로 하여 12~14시간 展開하였다.

이것을 3~4시간 30°C에서 乾燥시킨 다음 0.2% -ninhydrin-acetone 용액을 여지의 全面에 분무하여 60°C에서 3分間 예비 發色시킨다음 2% -ninhydrin acetone 용액을 나타난 spot 中心에 pipette 로 0.3ml 씩 침투시켜 60°C에서 3分間 加熱하여 本發色을 하였다.

다음에 pH7.0, M/25-phosphate buffer 용액을 여지의 앞뒤에 분무한 다음 60°C에서 40分間 加熱하였다.

흰색된 L-GA spot 사방을 5mm 정도의 여백을

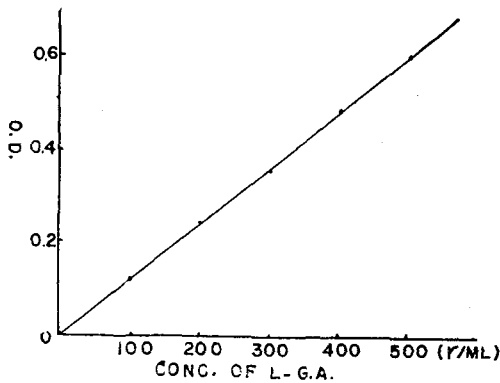


Fig 1. Typical Standard Curve of the L-glutamic acid by Paperchromatography

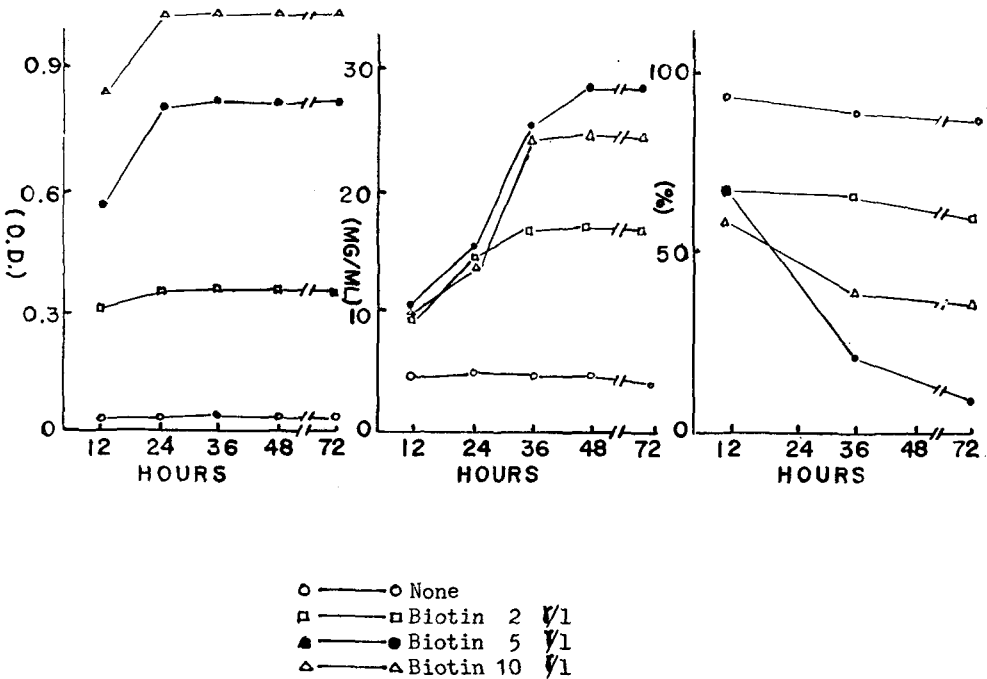


Fig 2. Effect of Biotin Concentration on the Cell Growth, L-glutamic acid Yield and Residual Sugar by *Brevibacterium flavum*

남겨서 여지를 끈은 다음 Crip로 집어서 미리 준비한 증기탕에 여지를 넣어 90秒間 發色시켰다.

發色이 끝난 여지의 spot 만을 오려서 시험관에 넣고서 pH 7.0, M/25-phosphate buffer soln, Methanol 각 2.5ml 씩 加하여 30°C에서 3시간 放置한 다음 色素를 完全히 溶出시켜 spectrophotometer 를 使用하여 570m μ 에서 optical density 를 測定한 다음 standard curve 에서 L-GA 의 量을 얻었다.

Fig 1이 L-GA Standard curve 이다.

5. 糖定量⁽²⁷⁾

Lehmann School 法에 依한 直接還元糖法으로 定量하였다.

III. 實驗結果 및 考察

1. 炭素源으로 Glucose 10% 培地 使用時의 生育度, L-GA 生成과 殘糖의 變化

① Growth factor 로 Biotin 使用時의 生育度, L-GA 生成과 殘糖의 變化

Biotin 농도를 2 γ /l, 5 γ /l, 10 γ /l 와 무첨가 배지를 使用한 結果는 Fig. 2이며 이때 生育度는 10

7/l 일때 1.08로 가장 良好 하였고 L-GA 生成은 57/ml 일때 28.4mg/ml 가 가장 良好하였으며 이때의 殘糖은 4.9%였다.

② Growth factor 로 Desthiobiotin 使用時의 生育度, L-GA 生成과 殘糖의 變化.

Desthiobiotin 濃度를 27/l, 57/l, 107/l 와 무첨

가 培地를 使用한 結果는 Fig. 3이며 生育度는 107/l 일때 1.16, L-GA 生成은 57/l 일때 29.2mg/ml 로서 가장 良好 하였으며 이때의 殘糖은 4.9%였다.

③ Growth factor 로 7,8-Diaminopelargonic acid 使用時의 生育度, L-GA 生成과 殘糖의 變化

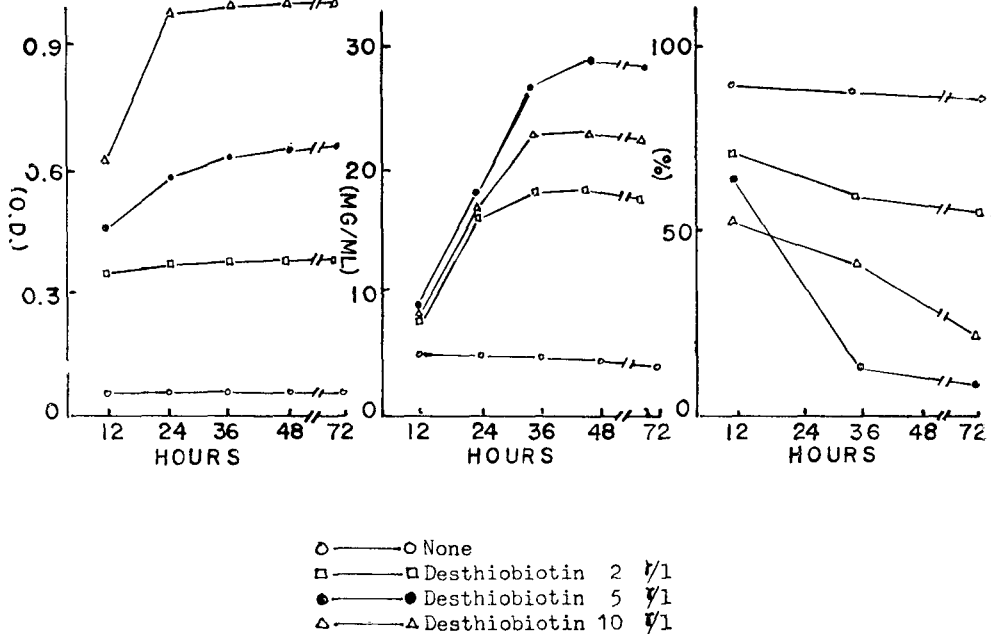


Fig 3. Effect of Desthiobiotin Concentration on the Cell Growth, L-glutamic acid Yield and Residual Sugar by *Brevibacterium flavum*

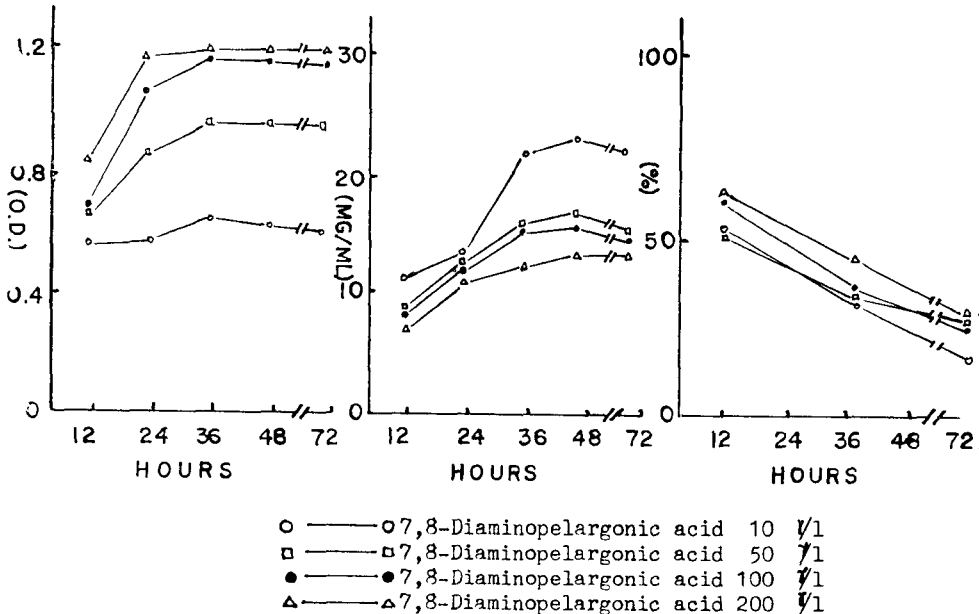


Fig 4. Effect of 7,8-Diaminopelargonic acid Concentration on the Cell Growth, L-glutamic acid Yield and Residual Sugar by *Brevibacterium flavum*

7.8-Diaminopelargonic acid 10 γ /l, 50 γ /l, 100 γ /l, 200 γ /l를 사용한 결과는 Fig. 4이며 生育度는 200 γ /l일때 1.15로 가장良好하였고, L-GA生成은 10 γ /l일때 23.0mg/ml로 가장良好하였

으며 이때의 殘糖은 16.7%였다.

④ Growth factor로 Bisnorbiotin 사용시의 生育度 L-GA生成과 殘糖의變化

Bisnorbiotin 5 γ /l, 10 γ /l, 50 γ /l, 100 γ /l를 사용

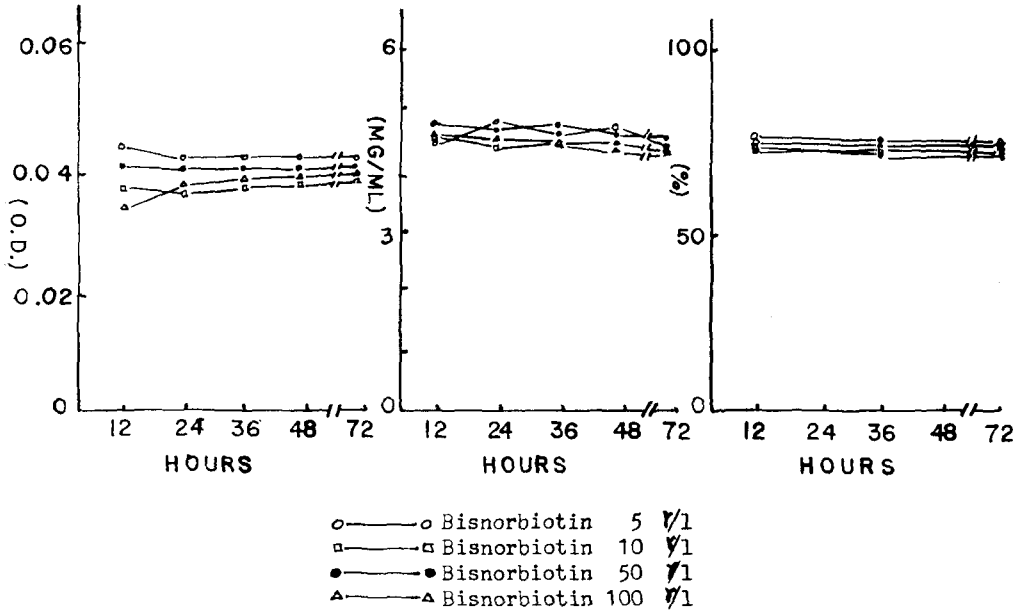


Fig 5. Effect of Bisnorbiotin Concentration on the Cell Growth, L-glutamic acid Yield and Residual Sugar by *Brevibacterium flavum*

한 결과는 Fig. 5이며 Fig 2, 3에서 보여준 무첨가 培地의 결과와 거의一致 하였으며 또한 Bisnorbiotin의 濃度에 따른變化가 거의 없었기 때문에 Bisnorbiotin은 生長促進效果가 없는것으로 생각된다.

2. 炭素源으로 Glucose-Acetate 混合培地 사용时的 生育도와 L-GA生成의變化

Carbon source로 acetate를 사용 할때에는 corn steep liquor가 必須因子로^(18,19)作用하여서 C. S. L (corn steep liquor)이 없으면 菌增殖이 거의 되지 않는다.

그 이유는 C. S. L의 Reducing sugar의 含量이 6.8% 정도 함유되어 있기 때문인 것으로 보아서 本實驗에서는 glucose를 0.1, 0.5, 1, 2%의 4區分으로 나누어서 glucose-acetate 混合培地를 사용하였다.

또한 C. S. L을 사용하지 않은 가장 큰 理由는 Biotin free 培地를 사용하여 實驗하려는데 起因하였다.

앞의 glucose 培地에서 實驗한 것을 토대로 하여 Biotin vitamer의 濃도는 Biotin 5 γ /l, Desthiobiotin

5 γ /l, 7.8-Diaminopelargonic acid 20 γ /l를 取하였 으며 Bisnorbiotin은 濃度에 따른變化가 거의 없었기 때문에 5 γ /l를 사용하였다.

① Glucose 0.1%-acetate 混合培地 사용时的 生育도와 L-GA生成의變化

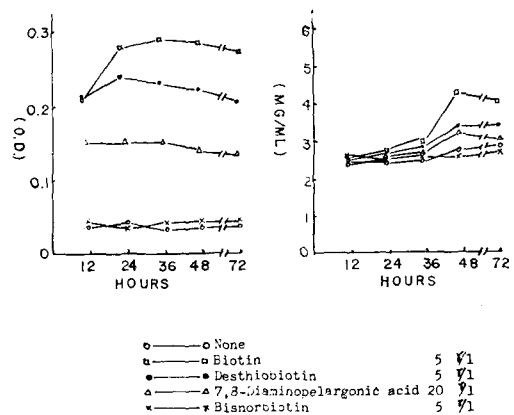


Fig 6. Effect of various Biotin Vitamers on the Cell Growth and L-glutamic acid Yield by *Brevibacterium flavum* in 0.1% Glucose Acetate mixed Medium

glucose 0.1%-acetate 混合培地에서 培養시킨 結果는 Fig. 6이며 生育도와 L-GA 生成은 Biotin 에서 各各 0.296, 2.98mg/ml 로 가장 良好하였다.

Bisnorbiotin 은 무첨가 培地와 거의 一致하였다.

② Glucose 0.5%-acetate 混合培地 使用時의 生育도와 L-GA 生成의 變化

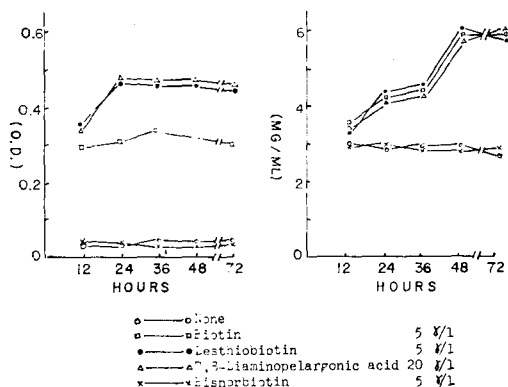


Fig 7. Effect of various Biotin Vitamers on the Cell Growth and L-glutamic acid Yield by *Brevibacterium flavum* in 0.5 % Glucose Acetate mixed Medium

Glucose 0.5%-acetate 混合培地에서 培養시킨 結果는 Fig. 7이며 生育도는 7.8-Diaminopelargonic acid 에서 0.480으로 가장 良好하였으며 L-GA 生成은 Desthiobiotin 에서 6.28mg/ml 로 가장 良好하였다.

Bisnorbiotin 은 무첨가 培地의 경우와 거의 一致

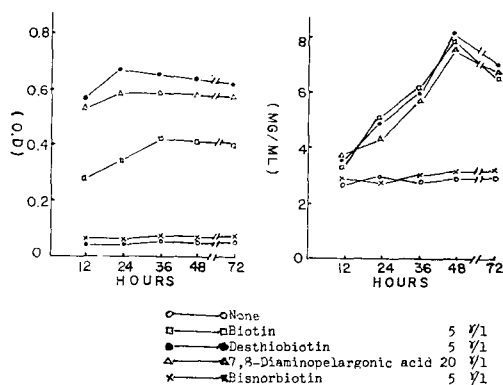


Fig 8. Effect of various Biotin Vitamers on the Cell Growth and L-glutamic acid Yield by *Brevibacterium flavum* in 1% Glucose Acetate mixed Medium

하였다.

③ Glucose 1%-acetate 混合培地 使用時의 生育도와 L-GA 生成의 變化

Glucose 1%-acetate 混合培地에서 培養시킨 結果는 Fig. 8이며 Desthiobiotin 에서 生育도, L-GA 生成은 各各 0.625, 8.53mg/ml 로 가장 良好하였으며 Bisnorbiotin 은 무첨가 培地의 경우와 거의 一致하였다.

④ Glucose 2%-acetate 混合培地에서 培養時의 生育도와 L-GA 生成의 變化

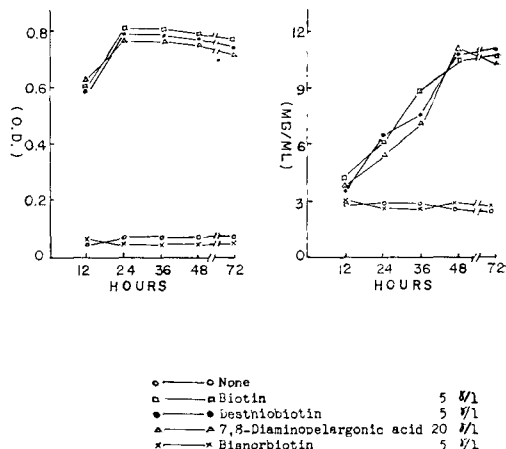


Fig 9. Effect of various Biotin Vitamers on the Cell growth and L-glutamic acid Yield by *Brevibacterium flavum* in 2% Glucose Medium

Glucose 2%-acetate 混合培地에서 培養시킨 結果는 Fig. 9이며 生育도는 Biotin 에서 0.821로 가장 良好하였으며 L-GA 生成은 7.8-Diaminopelargonic acid 가 11.1mg/ml 로 가장 良好하였다.

Bisnorbiotin 은 무첨가 培地의 경우와 거의 一致 하였다.

Carbon source 로서 glucose 를 使用한 結果보다 L-GA 生成이 나쁜理由는 Biotin 濃도가 Tsunoda (18,19) 등이 指摘한 最適濃度보다 높은 濃度를 使用하였고 Initial acetate 의 濃도가 低濃度인데 比하여 feeding 量을 많이 使用 하였기 때문인 것으로 간주 된다.

3. 炭素源으로 各種有機化合物을 使用 할때의 生育도와 L-GA 生成

本實驗에서 使用한 有機化合物은 Methanol, Ethanol, Ethylacetate, Acetic acid (free acetate), Na-acetate : NH₄-acetate = 2 : 1 등의 다섯가지 基

質의 各各에 glucose 2%를 첨가한 混合培地를 使用하여 48시간 培養後에 生育度와 L-GA 生成

을 比較 檢討하였다.

그 結果는 Table 4와 같다.

Table 4. Effect of Various Biotin vitamers in Glucose 2% and Various Substrates Medium

Substrates Analysis Biotin Vitamins	Methanol		Ethanol		Ethylacetate		Acetic acid		NH ₄ ⁺ Na ⁻ Acetate	
	Cell- Growth (O. D.)	L-GA yield (mg/ml)	Cell- Growth (O. D.)	L-GA yield (mg/ml)	Cell-A Growth (O. D.)	L-G Ayield (mg/ml)	Cell- Growth (O. D.)	L-GA Ayield (mg/ml)	Cell- Growth (O. D.)	L-GA yield (mg/ml)
None	0.030	3.9	0.035	4.1	0.036	4.8	0.034	4.9	0.041	5.0
¹ Biotin	0.043	5.2	0.184	5.4	0.294	6.8	0.453	9.2	0.581	11.2
² DTB	0.044	5.1	0.160	5.9	0.281	6.7	0.431	9.4	0.508	10.9
³ 7.8-DAPA	0.039	5.4	0.148	5.8	0.295	6.9	0.493	10.0	0.519	11.4
⁴ BNB	0.030	3.9	0.036	4.2	0.041	4.7	0.042	4.8	0.042	4.9

1. Biotin (5γ/l)

3. 7.8-Diamino pelargonic acid (20γ/l)

2. Desthiobiotin(5γ/l)

4. Bisnorbiotin (5γ/l)

이 結果 生育度와 L-GA 生成은 Na-acetate : NH₄-acetate=2 : 1 > Acetic acid (free acetate) > Ethylacetate > Ethanol > Methanol 의 순으로 나타 났다.

本實驗에서 Methanol 은 資化가 거의 없었으며 Ethanol 의 資化가 나쁜것은 Kanazaki⁽²⁴⁾ 등이 報告한 結果와 一致하였다.

Bisnorbiotin 은 有機化合物 培地에서도 glucose, glucose-acetate 混合培地의 結果와 같이 무첨가 培地의 結果와 거의 一致하였다.

以上の 結果 Bisnorbiotin 은 growth factor 로서 L-GA 醱酵에서 醱酵促進效果가 거의 없음을 알았다.

IV. 要 約

1) 炭素源으로서 glucose medium 에서 *Brevibacterium flavum* 을 培養할때 Biotin 5γ/l, Desthiobiotin 5γ/l, 7.8-Diaminopelargonic acid 10γ/l 에서 L-GA 生成이 가장 良好하였다.

2) 炭素源으로서 glucose-acetate 混合培地를 4 區分하여 使用한 結果 生育度, L-GA 生成은 glucose 2%-acetate 混合培地가 가장 良好하였다.

3) 炭素源으로서 Methanol, Ethanol, Ethylacetate, Acetic acid (free acetate), Na-acetate : NH₄-acetate=2 : 1 의 培地를 使用한 結果 Na-acetate : NH₄-acetate=2 : 1 > Acetic acid (free acetate) > Ethylacetate > Ethanol > Methanol 의 순으로 L-GA 生成이 나타났다.

4) 生長促進劑로 各種 Biotin vitamer 를 첨가

하고 炭素源으로 glucose 또는 Acetate 培地를 使用하였을때 要求되는 濃度は Biotin 에 對하여 Desthiobiotin 은 대략 同量, 7.8-Diaminopelargonic acid 는 3~4倍 였으며 Bisnorbiotin 은 代替效果가 없었다.

REFERENCES

- 1) Okumura. S, R. Tsugawa, T. Tsunoda, T. Matsui, K. Tono, & N. Moiyaji. : The monthly meeting of Agricultural Society of Japan on May (1959)
- 2) Tanaka. K, T. Iwasaki, & S. Kinoshita, : J. Agr. Chem. Soc. 34. 593. (1960)
- 3) Oishi. K, K. Aida, & T. Asai. : J. Agr. Chem. Soc. 35. 9. (1961)
- 4) Melville. D. B. K. Dittmer, G. B. Brown & V. du. Vigneaud. : Science. 98. 497. (1943)
- 5) Dittmer, K. D. B. Melville & V. du. Vigneaud. : Science. 99. 203. (1944)
- 6) Lilly, V. G. and L. H. Leonian. : Science. 99. 205. (1944)
- 7) Okumura. S, R. Tsugawa. T. Tsunoda. & A. Kitai. : J. Agr. Chem. Soc. 36. 3. 197. (1962)
- 8) Melville D. B. : J. Am. Chem. Soc.
- 9) Dittmer K., and V. du. Vigneaud. : Science. 100. 129. (1944)
- 10) Tatum E. L. : J. B. C. 160. 455. (1945)

- 11) Ryan F. J. :
The Japanese Journal of Genetics. 31. 265.
(1956)
- 12) Okumura. S., R. Tsugawa, T. Tsunoda. &
S. Motozaki. :
J. Agr. Chem. Soc. 36. 3. 204. (1962)
- 13) Okumura. S., R. Tsugawa, T. Tsunoda. &
Motozaki. S. :
J. Agr. Chem. Soc. 36. 6. 506. (1962)
- 14) Okumura. S., K. Kinoshita, R. Tsugawa,
H. Okada & Tsunoda. T. :
Amino acid & Nucleic acid. 5. 33. (1962)
- 15) H. C. Yang, M. Kusumoto, T. Tochikura.
& K. Ogata. :
Agr. Biol. Chem. 34. 3. 370. (1970)
- 16) H. C. Yang, Y. Tani, & K. Ogata. :
Agr. Biol. Chem. 35. 6. 870. (1971)
- 17) Shiio. I, K. Mitsui, and T. Tsunoda:
J. Biochem. 46. 1655. (1959)
- 18) Tsunoda. T, I. Shiio, & K. Mitsugi. :
J. Gen. Appl. Microbial. 7. 18. (1961)
- 19) Tsunoda. T., I. Shiio and K. Mitsugi:
J. Gen. Appl. Microbial. 7. 30. (1961)
- 20) Kimura. K.
J. Gen. Appl. Microbial. 10. 23. (1964)
- 21) Okada. H., I. Kameyama, S. Okumura and
T. Tsunoda. :
Amino acid & Nucleic acid. 3. 26. (1961)
- 22) Okumura. S., R. Tsugawa, T. Tsunoda, K.
Kono, T. Matsui & N. Miyachi. :
J. Agr. Chem. Soc. 36. 2. 141. (1962)
- 23) Shiio. I. : J. Biochem. 47. 3. 273. (1960)
- 24) Kanazaki. T., K. Kitano, Y. Sumino, and
H. Okazaki. :
J. Agr. Chem. Soc. 46. 2. 95. (1972)
- 25) Maruta. Y., H. Samejima and M. Tanaka:
J. Agr. Chem. Soc. 30. 10. 775. (1956)
- 26) Watanabe. Y., K. Watanabe, F. Koide, T.
Saito & K. Shimura. :
J. Agr. Chem. Soc. 34. 620. (1960)
- 27) Department of Tokyo Agricultural Chemistry.
"Experimental of Agricultural Chemistry."
Vol. 2. Asakura Books Co. Ltd. P. 638. (1969)