

## 고온성 사상균의 효소에 관한 연구

### (제 5 보) Xylanase 의 정제

김 관\* · 김 양 희 · 정 동 호

\*전남대학교 농과대학 · 중앙대학교 농과대학

### Studies on Enzyme of the Thermophilic Mold (PartV.) Purification of Xylanase

Kwan Kim\* · Young Hee Kim · Dong Hyo Chung

\*College of Agriculture, Jun Nam National University

College of Agriculture, Chung Ang University

(Received September 2, 1974)

#### Abstract

1) Two xylanase (designed as A and B) of *Myriococcus albomyces* were purified from an extract of wheat koji culture. Purification steps included first ammonium sulfate fractionation followed successively by SE-Sephadex column chromatography, DEAE-Sephadex column chromatography and gel filtration on Sephadex G-100 respectively.

2) The optimum pH and pH stability for crude xylanase were found to be pH 5.0 and pH 4.0-7.0 respectively.

3) The optimum temperature was found to be 50°C and for the thermal stability of xylanase, the enzyme incubated at 65°C for 60 min did not affect their stability.

4) The purified xylanase A and B were considered as liquefying xylanase and saccharogenic xylanase respectively.

5) The xylanase A was most active at pH 4.0 and range of pH 3.0-8.0 at 30°C for six hrs. The B was most active at pH 5.0 showing stability range of pH 4.0 to 8.5 at 30°C for 6 hrs. incubation respectively. The optimum temperature of xylanase A and B were found to be 70°C and 65°C for 60-min respectively.

#### 서 론

고등식물의 세포벽의 주요 성분의 하나는 xylan 으로 섬유소와 같이 널리 분포되어 있다. 특히 목재나 화본과(禾本科) 식물체에는 그 함량이 많아 5~50%나 달하고 있다<sup>(1)</sup>. 육상식물의 xylan 은  $\beta$ -1,4-Xylopyranoside 결합이지만<sup>(2)</sup>, 그의 기원에 따라 glucose, aralinose, glucuronic acid 등을 약간 함유하기도 한다<sup>(3)</sup>.

그러나 해조류에는  $\beta$ -1,3-xylopyranoside 결합을 한 xylan 도 Seilire<sup>(4)</sup> 와 MC Collum<sup>(5)</sup> 은 토끼와 소의 창자내에 xylan 을 분해하는 미생물이 있다는 것을 처음 발표하였고 아울러 달팽이에도 이들 분해효소가 있다고 하였다. Schmidt<sup>(7)</sup> 씨는 토양에서 분리된 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속 등은 옥수수 의 xylan 을 분해시킨다 하였다.

그러나 xylan 이 효소적으로 분해된다는 것은 Ehrenstein<sup>(8)</sup> 씨가 처음으로 달팽이의 소화액으로

서 증명하였다. 그 이후 xylan의 분해효소  $\beta$ -1, 4-xylan xylanohydrolase(이하 xylanase라 칭함)는 맥아 중<sup>9)</sup> *Aspergillus oryzae*<sup>10)</sup>, *Aspergillus letatae* 속<sup>11)</sup>, *Penicillium penicillium chrysogenum*<sup>12)</sup>, *Chaetomium* 속<sup>14)</sup> 특히 *Chaetomium trilaterale* No. 2294 균주는 각종 xylan을 24시간동안 92%까지 xylose를 분해한다. 하였고<sup>15)</sup>, 이들 효소를 결정화시켰다<sup>16)</sup>. *Aspergillus niger*<sup>17)</sup> *Streptomyces* 속<sup>18, 19, 20, 21)</sup> 특히 目下씨 등은 방사선균의 균체의 xylanase에 대하여 연구한바 있고<sup>22)</sup>, Iizuka 씨 등은 토양에서 xylanate 생산균을 분리하여 *streptomyces xylophagus* nov. sp. 라는 새로운 종으로 명명하였다<sup>23)</sup>.

이들 의도 *Fusarium oxysporium*<sup>13)</sup>, *Schizophyllum*, *Srametes*, *E. Chinodontium*, *Alternaria*, *Celphalosporium*, *Cercospora*, *Glomerella*, *Mesocosporium*, 속에도 xylanase activity가 있다고 하였다<sup>20)</sup>. Whistler 씨 등은 *Aspergillus goevidus*에서 생성되는 xylanase는 2종이 있다 하였고, simpson<sup>25, 26)</sup> 씨는 xylanase는 유도효소(inductive enzyme)라 하였다. 한편 Sørensen<sup>27)</sup> 씨는 어떤 세균이나 *streptomyces* 속의 xylanase에는 xyloside 결합을 xylobiose unit로 가수분해하는 2종의 효소가 있다고 하였다.

Inaoka<sup>28)</sup> 등은 *Bacillus subtilis*의 배양액에서 결정 xylanase의 효소표품(酵素標品)을 얻고 이 순수 효소의 작용 양식에 따라 액화형(endoenzyme)과 당화형(exoenzyme) xylanase가 있음을 알았다.

곧 이어 Fukui<sup>29)</sup> 씨 등은 *Aspergillus batatae*<sup>44)</sup>와 *Bacillus subtilis*에서 액화형 효소를 결정화하였다.

한편 *Chaetomium globosum* AZ의 반합성 배양액 중에는  $\beta$ -1, 4-xylanase ( $\beta$ -1, 4-xylan xylanohydrolase)와 성질이 다른  $\beta$ -1, 3-xylanase ( $\beta$ -1, 3-xylan 3-xylanohydrolase)라는 새로운 효소를 분리(單離)하였다<sup>30, 31)</sup>.

근래 효소화학의 급속한 진보와 더불어 xylan의 효소적 분해의 목적으로 bacterial xylanase의 연구에서 기초적 배양조건, 효소의 결정화와 효소화학적 성질을 밝힌바 있으며<sup>22, 32-37)</sup> cellulase 생성균으로 알려진 *Trichoderma virida*의 한균주는 xylan의 당화력도 강해서 활엽수의 xylan을 15%까지 분해한다는 보고도 있어<sup>39)</sup>, xylan의 효소분해공업의 가능성을 예시하고 있다.

최근 竹西<sup>40)</sup> 씨 등은 *Penicillium janthinellum*의 xylanase의 밀기울 추출액 중에서 SE-Sephadex와

Sephadex G-100의 column chromatography로 xylanase를 분리한바 있다.

저자들은 고온성 사상균인 *Myriococcum albomyces*<sup>41)</sup>가 생산하는 xylanase의 조제효소(粗製酵素)의 성질과 정제한 효소의 화학적 성질에 대하여 그 일부를 보고한다.

## 실험재료 및 방법

**기질 Xylan:** 사용된 기질은 日本和光회사 특급품을 사용하였다.

**사용균주:** *Myriococcum albomyces*<sup>41)</sup>

**배양방법과 효소용액:** 다음 Table 1 조성의 밀기울 액체배양기를 45°C에서 jar fermentor로 132시간 배양한 배양액을 6,000 rpm으로 원침하고 그 상등액을 0.1N NaOH로 pH를 4.5로 조절하였 황산암모늄 0.2포화도에서 생기는 침전을 버리고 0.8포화도에서 얻은 갈색 침전 부분만을 동결건조시켜 두었다.

이 조작으로 추출액중 xylanase 활성의 90% 이상이 침전되었다. 필요에 따라 100배로 희석하여 Sephadex G-25(coarse)의 chromatography로서 황산암모늄을 제거하거나 fish skin tube로 수도물에서(0°C) 2일간 투석하여 투명한 조제 효소액을 얻고 다시 pH 4.5에서 하룻밤 투석하였다가 xylanase의 여러 성질을 검토하였다.

**Xylanase activity:** Monod 진탕기용 L형 시험관에(내경 17~19 mm, 수직부 70 mm, 수평부 115 mm) 1% xylan 현탁액 5ml, pH. 4.5, McIlvaine buffer 4 ml, 투석한 조제효소용액 1 ml를 넣고 Monod 황은 진탕기에서(45°C) 일정시간 반응시켜 그 반응액 2.5 ml를 취하여 이때 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson<sup>42, 43)</sup> 법으로 정량하고 반응액 1 ml당 생성되는 환원당으로 그의 활성을 나타내었다.

Table 1. Composition of Wheat Bran Liquid Medium

Wheat bran	5%
Xylan	1%
Ammonium citrate (dibasic)	0.3%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1%
NaNO <sub>3</sub>	0.3%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05%
Initial pH	5.5

**단백질의 정량:** Lowry<sup>44)</sup> 씨 등의 Folin-구리시약을 사용하여 750 m $\mu$ 의 흡광도를 측정하여 단백질은 Hammarsten의 milh casein (E. Merk 계)의 상

당량에 환산하였다.

**SE-Sephadex 에 의한 column chromatography:** 미리 pH. 5.5 0.01 M acetate buffer 에서 충분히 완충화한 SE-Sephadex C-50 Column 에 효소용액의 농도가 약 0.01 M 정도가 되게 pH.5 acetate buffer 로 희석하여 흡착시켰다. 다음에 pH. 5.0, 0.01M. acetate buffer 로 Column 을 충분히 세정한 후 NaCl 의 농도를 linear gradient 로 상승시켜 흡착된 효소를 용출(10 ml) 시켰을.

**DEAE-Sephadex A-25 에 의한 chromatography:** SE-Sephadex . 통과한 액을 pH. 5.0, 0.01 M acetate buffer 로 충분히 완충화한 DEAE-Sephadex A-25 Column 에 추가하고 역시 NaCl 의 농도를 linear gradient 로 효소를 용출시켰다.

**Sephadex G-100 에 의한 gel 여과:** 먼저 이온

교환체인 chromatography 에 의하여 얻은 효소 활성 fraction 을 polyethylene glycol(No. 3,000) 에 대하여 투석하여 농축시키고 다음에 Sephadex G-100 column 에 의한 gel filtration 하였다.

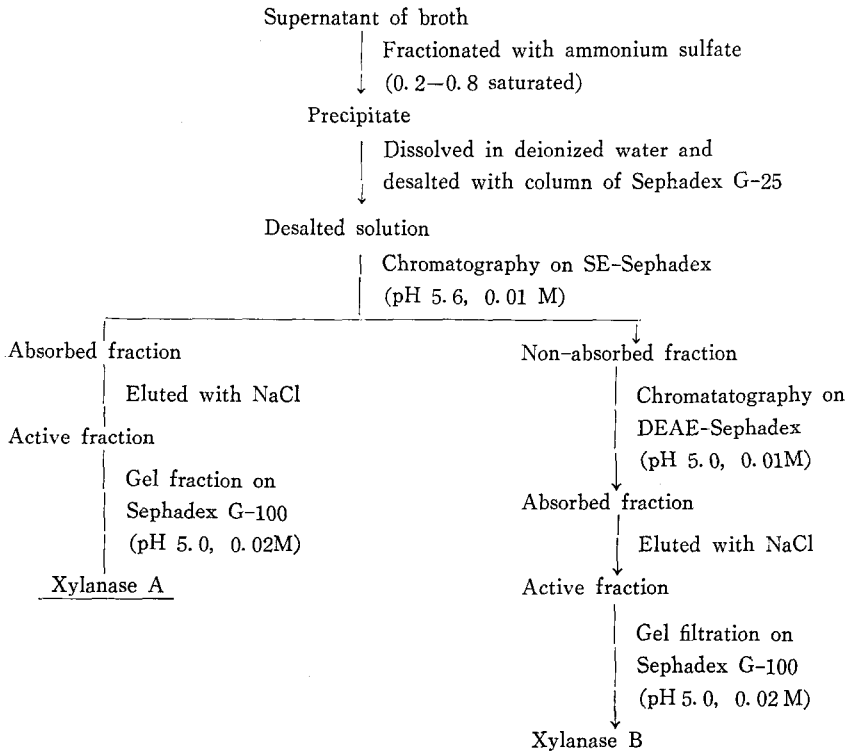
**Paper chromatography:** Chromatography 에서 얻은 각 fraction 을 xylan 에 대하여 작용시켜 시간별로 paper chromatography 하였다.

즉, 전개제는 *n*-butanol: acetic acid: Water= 4:1:5, 전개법은 상승법, 발색제는 Aniline-phthalate 를 사용하였다.

흡광도 측정: 효소단백질의 흡광도는 Spectrophotometer Model DU 로 측정하였다.

효소의 정제: 배양액을 황산암모늄 0.8 포화에서 침전을 제거하고 0.8포화까지 생기는 갈색침전 부분만을 Tabel 2 에 따라 분별정제하였다.

Table 2. Purification procedure of xylanase



### 결과 및 고찰

**Xylanase 최적 pH:** Xylan 용액을 완충용액으로 pH 2.5 에서 pH 8.0 으로 조절한 다음 45~50 °C 에서 효소활성을 상대활성으로 표시한 만는 Fig. 1 와 같다.

Fig. 1 에서와 같이 xylanase 는 pH 5 에서 최대의 효소활성을 나타내고 있다.

다른 미생물들의 xylanase 들에서 *Chaetomium trilaterale*<sup>15)</sup> 의 경우는 pH 4~5, *ASP. batatae* 에서 pH 4.5~5.0<sup>21)</sup>, *Asp. niger* 에서 pH 4, 2 *Trichoderma viride*<sup>28)</sup> 에서 pH 4.2~5.6, *Chaetomium*

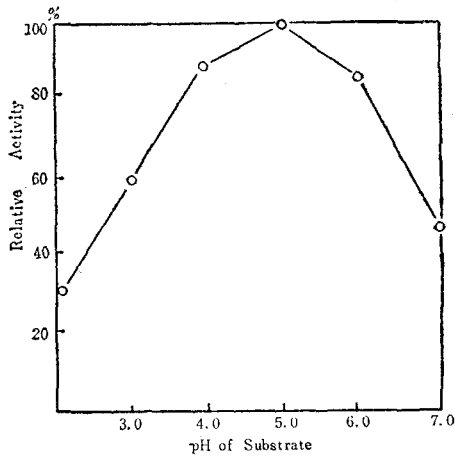


Fig. 1. pH Dependence of crude Xylanase Activity

*globosum* AZ<sup>36)</sup>에서 pH 3.5이나 *Streptomyces xylophagus* nov. sp<sup>23)</sup>는 pH 4.5~7.0 범위이고 세균<sup>35)</sup>은 pH 6.0~7.2로 xylanase의 최적 pH는 곰팡이에서는 미산성이고 세균이나 방사선균은 중성인 것 같다.

**Xylanase의 안정 pH:** 조제 효소용액을 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH 및 완충용액으로 pH를 2.5에서 pH 8.0까지 조절하고 같은 온도에서 일정시간 방치한 후 잔존 효소력을 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다.

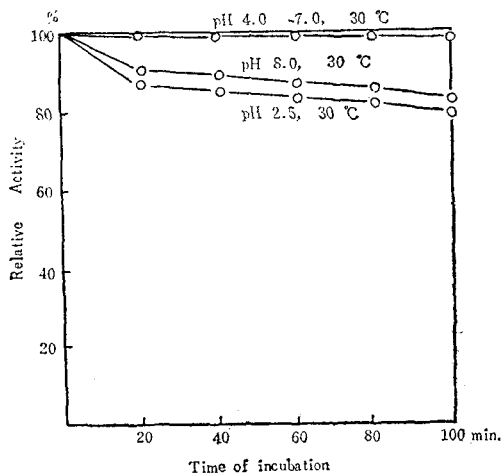


Fig. 2. Effect of pH on Stability of crude Xylanase Activity

Fig. 2와 같이 pH 4.0에서 pH 7.0 범위내에서는 100분간 방치한 후에도 효소역가는 저하되지 않았으나 pH 2.5에서 20%, pH 8.0에서 15% 정도 불활성되는 것을 알 수 있다.

다른 미생물의 경우를 보면 *Chaetomium trilaterae*<sup>15)</sup>에서 pH 4.2~8.0, *Streptomyces xylophagus* nov. Sp의 그것은 pH 5.0~7.5로 상당히 좁은 pH 범위를 가져 pH 4 이하이나 pH 8 이상에서는 쉽게 불활성화 된다고 한다<sup>22)</sup>.

이와 같이 최적 pH와 안전 pH균중, 균주에 따라 상당히 다른 것을 알 수 있다.

**Xylanase의 최적온도:** 반응용액을 최적 pH로 조절한 다음 30~80°C에서 효소활성을 상대활성으로 나타내는 결과는 Fig. 3과 같다.

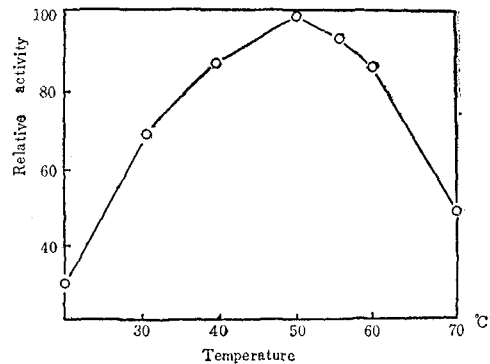


Fig. 3. Temperature Dependence of crude Xylanase Activity

Fig. 3과 같이 xylanase는 50~55°C에서 최적온도를 가진 것을 알 수 있다.

이는 다른 미생물의 최적온도보다 5°C 내지 15°C 높다는 것으로 보아 역시 고온성 미생물의 경우는 최적 pH 보다 최적온도가 특이하다는 것을 알 수 있다.

고온성 미생물이 아닌 *Streptomyces xylophagus* nov. sp<sup>23)</sup>의 Xylanase의 최적온도가 65°C인 것으로 알려져 있으나 70°C에서 30분간 90% 이상이 실활(失活)되는 것으로 보아 사실은 최적온도가 이보다 낮은 것이 아닌가 추측된다.

**Xylanase의 열에 대한 안정성:** 조제 효소용액을 65°C에서 방치하면서 잔존 효소역가를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4와 같이 xylanase는 65°C에서 65분간은 안정하였으나 그 후는 효소활성이 급격히 저하되

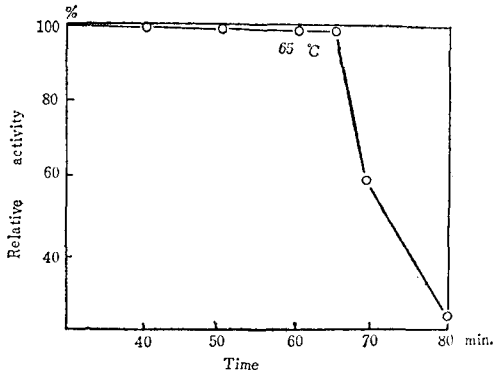


Fig. 4. Thermal Stability of crude Xylanase Activity

었다.

*Chaetomium trilaterale*<sup>15)</sup>의 경우는 70°C에서 10분간에 거의 실활된다고 하며 bacterial xylanase<sup>34)</sup>도 50°C에서 안정하나 70°C에서 순식간에 불활성화 된다고 한다.

이상의 결과로 *Myriococcum albomyces*의 배양 추출액에는 cellulase 뿐만 아니라<sup>41)</sup> β-1,4-xylan (xylan)을 가수분해하는 효소가 있음을 알 수 있다.

**SE-Sephadex chromatogram:** 황산암모늄 분획으로 얻은 갈색 침전물은 먼저 탈색과 동시에 효소를 분별 농축할 목적으로 Sephadex G-25 column으로 gel filtration 하였다.

이 gel 여과로 탈염·탈색·농축된 부분만을 SE-Sephadex column에 흡착시키고 식염 농도를 linear gradient로 상승시켜 흡착된 효소를 용출시킨 결

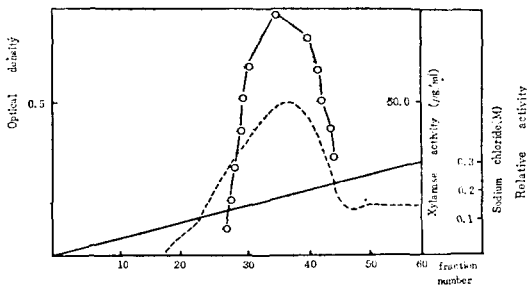


Fig. 5. Elution Pattern of crude Xylanase A (xylanase A) from a Column of SE-Sephadex G50.....; protein, —○—; xylanase, —: NaCl

과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5와 같이 SE-Sephadex column에 흡착된 구분은 단일의 성분으로 용출되었다.

**Sephadex G-100에 의한 여과상:** SE-Sephaex column에 용출된 부분을 Sephadex G-100으로 gel filtration한 결과는 Fig. 6과 같은 peak를 나타내었다.

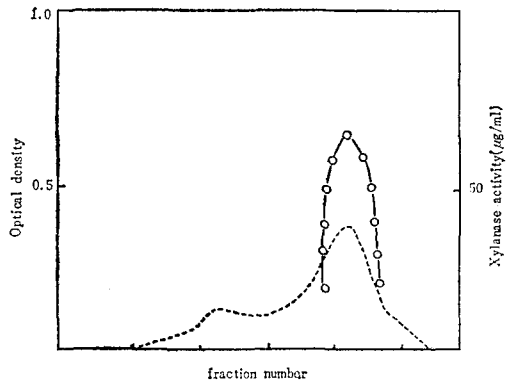


Fig. 6. Elution Pattern of Xylanase A from a Column of Sephadex G-108

.....; protein, —○—; xylanase

Fig. 6과 같이 단일의 peak로 보아 SE-Sephadex column에 흡착된 성분은 단일의 단백질(효소)로 생각되어 이를 xylanase A라 명명하였다.

**DEAE-Stephadex chromatogram:** 전기 SE-Sephadex column에 흡착 안되는 부분을 다시 ion exchange resin인 DEAE-Sephadex column에 흡

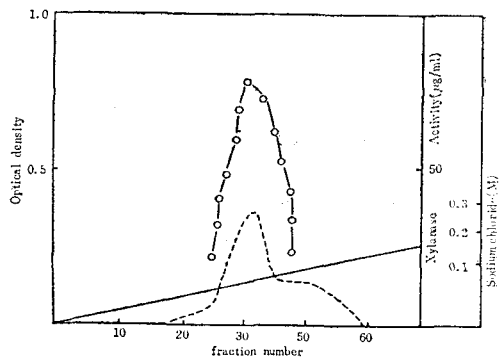


Fig. 7. Elution Pattern of crude Xylanase B from a Column of DEAE-Sephadex A50.....; protein, —○—; xylanase, —: NaCl

착시키고 역시 NaCl로 linear gradient로 용출한 결과는 Fig. 7과 같다.

Fig. 7과 같이 DEAE-Sephadex column에 흡착된 구분은 단일의 성분으로 용출되었다. 그리고 DEAE-Sephadex column에 흡착 용출된 구분을 Sephadex G-100으로 gel filtration한 결과도 역시 단일의 peak를 나타내는 것으로 보아 단일의 성분으로 간주된다. 이를 xylanase B라 명명하였다. 자외선 흡수 Spectrum: Xylanase activity가 있는 2개의 fraction A, B의 자외선 흡수를 측정한 결과는 Fig. 8과 같다.

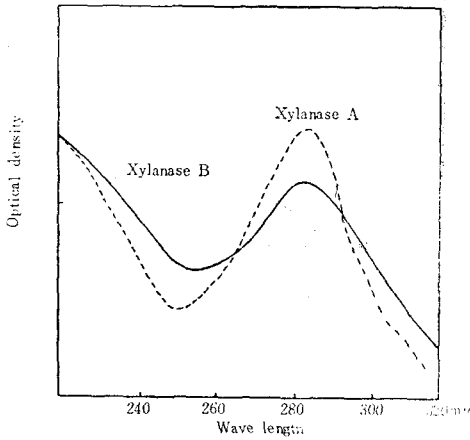


Fig. 8. Ultraviolet Absorption of Xylanase A and Xylanase B  
..... ; xylanase A, — ; xylanase B

어느 fraction 이던간에 최대흡수는 280 m $\mu$  이고 최소흡수는 250 m $\mu$ 으로 전형적인 단백질 흡수

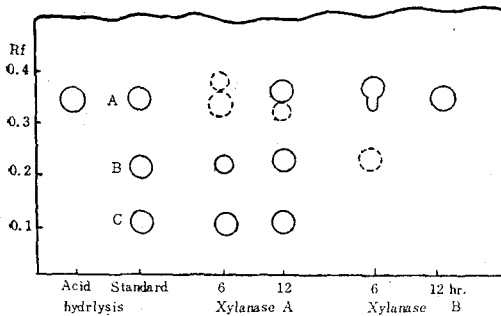


Fig. 9. Paper Chromatograms of Hydrolysis Product of Xylanase A and Xylanase B  
A: xylose, B: xylobiose, C: xylotriose, X: unknown

을 나타내었다.

기질에 대한 특이성: Xylanase에 대하여 Xylanase A와 xylanase B를 작용시켜 경시적으로 분해되는 당을 paper chromatography로 전개한 결과는 Fig. 9와 같다. Fig. 9와 같이 xylanase B가 반응되는 경우는 xylose만 생성되고 xylanase A의 경우는 xylobiose, xylotriose와 흔적의 미지의 성분(xylobiosaccharide, Unknown) 등이 생성됨을 알 수 있다.

이것으로 보아 xylanase B는 xylan 분자의 말단에서 xylose unit로 가수분해하는 것 같고 xylanase A는 xylobiose나 xylotriose, 아니면 xylooligosaccharide unit로 가수분해되는 것으로 생각되므로 xylanase A와 xylanase B는 별개의 효소인 것으로 간주된다.

최적 pH: Xylanase A, B에 대하여 50°C에서 각 pH의 활성을 측정된 결과는 Fig. 10과 같다.

Fig. 10과 같이 xylanase A의 최적 pH 4.0, Xylanase B의 그것은 pH 5.0임을 알 수 있다. 이 pH의 영역은 일반 다른 곰팡이에서 분비하는 각종 효소의 최적 pH와는 큰 차이가 없다<sup>15, 31, 38</sup>.

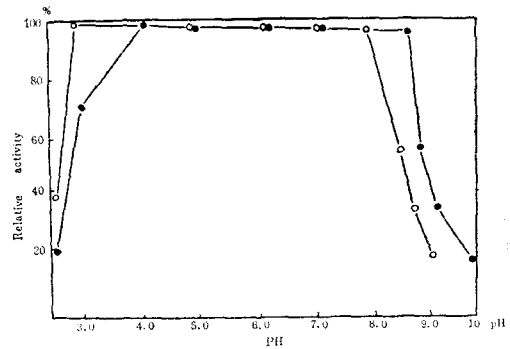


Fig. 10. pH Dependence of Xylanase B Activity  
—○— ; xylanase A, —●— ; xylanase B

pH 안정성: Xylanase A 및 Xylanase B. 여러 pH buffer에서 6시간 반응시킨후 그 잔존 활성을 측정된 결과는 Fig. 11과 같다.

Fig. 11과 같이 xylanase A의 pH 안정범위는 3.0~8.0이고 xylanase B는 4.0~8.5이나 이 범위보다 낮거나 높을 때는 급히 불안정함을 알 수 있다.

이 안정범위는 *Chaetomium trilaterale*<sup>15)</sup>이나 *Streptomyces xylophagus* nov. sp에 비하여 넓다.

요 약

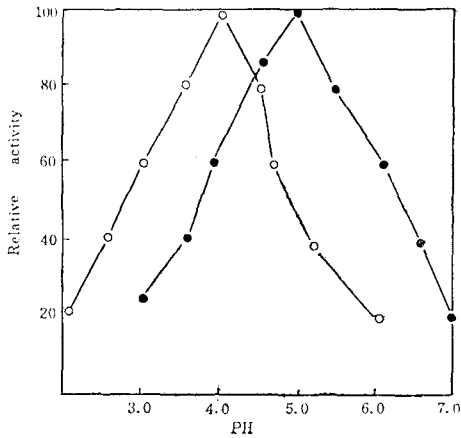


Fig. 11. pH Stability of Xylanase A and Xylanase B Activity  
—○— ; xylanase A, —●— : xylanase B

열에 대한 안정성 : Xylanase A, Xylanase B의 최적 pH에서 온도를 달리하여 가며 60분간 방치하고 잔존 활성을 측정할 결과는 Fig. 12와 같다.

Fig. 12와 같이 정제 xylanase A와 B는 다 같이 crude xylanase와 마찬가지로 역시 열에 안정하다.

이 열안정성은 다른 곰팡이 Xylanase의 그것보다 2~3배 강하다는<sup>15,34)</sup> 점은 본 내열성균의 생리적인 특성이란 것 같다.

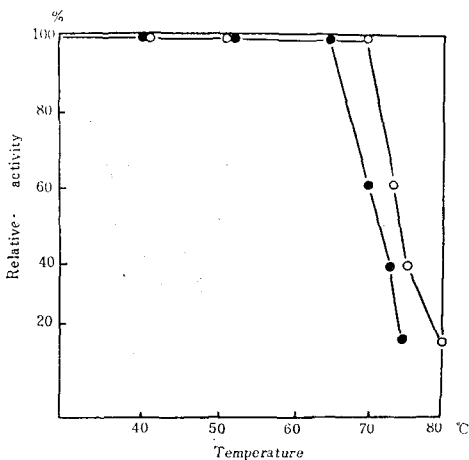


Fig. 12. Thermal Stability of Xylanase A and Xylanase B activity  
—○— ; xylanase A, —●— ; xylanase B

1. 고온성 사상균인 *Myriococcus albomyces*의 밀기울 액체배양액에는 xylanase 활성이 있다.

2. Xylanase의 최적 pH는 5.0이었다. 그리고 xylanase의 pH 안정범위는 pH 4.0~7.0이었다.

3. Xylanase의 최적온도는 50°C이었다.

4. Xylanase의 열안정성은 65°C에서 65분간 안정하였다.

5. 액체 배양액은 SE-Sephadex, DEAE-Sephadex 및 Sephadex G-100 column chromatography로 2종의 xylanase(A, B)를 분리하였다.

6. 정제 xylanase A는 액화형의 xylanase이고 정제 xylanase B는 당화형의 xylanase이었다.

7. 정제 xylanase A의 최적 pH는 4.0, pH 안정성 3.0~8.0 온도안정성은 70°C에서 60분간이었고 정제 xylanase B의 최적 pH 5.0 pH, 안정성 4.0~8.5 온도 안정성은 65°C에서 60분간이었다.

인용 문헌

- Whistler, R.L. and Smart, C. L.: *Polysaccharide Chemistry*, Academic Press, New York, p. 136(1953).
- Whistler, R.L. and Tu, C.C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1389(1953).
- Adams, A.A. and Castange, A.E.: *Can. J. Chem.*, **29**, 109(1951).
- Husemann, E.: *J. Prakt. Chem.*, **155**, 13 (1940).
- Seilhere, G.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **64**, 941(1908).
- McCollum, E.V. and Brannon, W.A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **31**, 1253(1909).
- Schmidt, E.G., Peterson, W. H. and Fred, E.B.: *Soil Sci.*, **15**, 479(1923).
- Ehrenstein, M.: *Helv. Chim. Acta*, **2**, 332 (1926).
- Lueers, H. and Volkmer, W.: *Xochenscher. f. Freueri*, **45**, 83(1923).
- 陽川又夫, 山根東一: *日農化*, **8**, 586(1932).
- Fukui, S. and Sato, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **21**, 392(1952).
- Soerensen, H.: *Nature*, **172**, 520(1953).
- Lyr, H. and Novak, K.: *Zeit Allg. Mikrobiol.*, **2**, 286(1961).

- 14) Soerensen, H.: *Nature*, **176**, 74(1955).
- 15) Kawaninami, T. and Iizuka, H.: *J. Ferm. Technol.* (Japan), **48**, 161(1970).
- 16) Kawaninami, T. and Iizuka, H.: *J. Ferm. Technol.*, **48**, 169(1970).
- 17) Youndt, A.T.: *Tappi.*, **34**, 92(1951).
- 18) Soerensen, H.: *Nature*, **177**, 845(1955).
- 19) Inaoka, K.: *Mem. Ehime Univ.*, **6**, 83(1961).
- 20) Iizuka, H. and Kawaninami, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1257(1969).
- 21) Kawaninami, T and Iizuka, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1787(1969).
- 22) 日下部切, 安井恒男, 小林達吉: 日農化 **43**, 145 (1969).
- 23) Iizuka, H. and Kawaninami, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 520(1965).
- 24) Whistler, R.L. and Mask, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **177**, 1241(1955).
- 25) Simpson, F. J.: *Can. J. Microbiol.*, **1**, 131 (1954).
- 26) Simpson, F. J.: *Can. J. Microbiol.*, **2**, 28 (1956).
- 27) Soerensen, H.: *Physiol. Plantarum*, **5**, 183 (1952).
- 28) Inaoka, M. and Soda, H.: *Nature*, **178**, 202 (1956).
- 29) Fukui, S. and Sato, M.: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **21**, 392(1957).
- 30) 福井作藏 鈴木武夫, 北原覺雄, 三輪知雄: 日農化, **34**, 48(1960)
- 31) Fukui, S., Suzyki, T. and Kitahara, K.: *J. Gen. Appl. Microbil.*, **6**, 270(1960)
- 32) 高橋光雄: 醱工誌, **41**, 116(1963).
- 33) 高橋光雄: 醱工誌, **41**, 119(1963).
- 34) 高橋光雄, 橋本揚之助: 醱工誌 **41**, 182(1963).
- 35) 高橋光雄, 橋本揚之助: 醱工誌 **41**, 186(1963).
- 36) 高橋光雄: 醱工誌 **41**, 309(1963).
- 37) 高橋光雄: 醱工誌, **41**, 312(1963),
- 38) 乃木和宏, 安井恒男, 清國繁夫, 小林達吉: 醱工誌, **46**, 634(1968).
- 39) 乃木和宏, 安井恒男, 清國繁夫, 小林達吉: 醱工誌, **47**, 313(1969).
- 40) 竹西繁行, 辻阪好夫: 醱工誌, **51**, 458(1973).
- 41) 鄭東孝: 韓農化, **14**, 59(1971).
- 42) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **198**, 9(1952).
- 43) Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375(1944).
- 44) Lowry, O.H., Resenbrough, N.J., Forr, A.C. and Randall. R.T.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1952).