Korean J. Appld. Microbiol. Bioeng.
Vol 2. *No.* 3 *Sept.* 1974

초산을 이용한 글루타민산의 발효생산에 관한 연구

(제 2 보) 글루타민산 생성을 위한 발효조건

하 덕 모·노 완 섭·서 동 하

동국대학교 공과대학 식품공학과

Studies on the Bacterial Production of L-Glutamate fromAcetate
Part II. Cultural Conditon

Duk Mo Hah, Wan Sup Noh and Dong Hah Suh

Department of Food Technology, College of Engineering

Dongguk University

(Received September 5, 1974)

Abstract

The cultural conditions for L-glutamate production were investigated using *Brevibacterium flavum* nov. sp. D2209B, the most productive strain among 5 strains reported in preceeding paper.

A temperature of 30°C and a medium volume of 30 ml per 500-flask were selected as standard culture conditions. And the following results were obtained.

1. When the concentration of acetate in the medium was below 30 g per litre, the maximum amount of L-glutamate was accumulated.

2. KH_2PO_4, $MgSO_4$, $FeCl_3$ and $MnCl_2$ were required for the L-glutamate poduction, but the concentration of those inorganic salts little effected.

3. Significant amount of L-glutamate was accumulated in the limited biotin concentration less than 0.3 ug per litre.

4. The addition of malic acid or succinic acid enhanced the accumulation.

5. The L-glutamate accumulation was related to the incubation time of seed; the amount of L-glutamate accumulated was maximum by inoculating 16-20 hour incubated seed.

6. In the medium containing sufficient amount of biotin for growth, L-glutamate accumulation was stimulated by the addition of penicillin at appropreate time during incubation.

서 론

전보[1] 에서 우리나라 각 지대의 토양으로 부터 초산을 이용하여 글루타민산 (L-GA)을 생산하는 균주를 분리하고 이들 균주중 글루타민산 생성능이 우수한 균주 5주의 미생물학적 성질을 보고하였으며 이들 5균주중에서 글루타민산 생성능이 가장 우수한 *Brevibacterium flavum* nov. sp. D2209B 균주를 이용하여 글루타민산 생산을 위한 발효조건에 관하여 실험 검토하였으므로 그 결과를 보고한다.

실험재료 및 방법

1. 공시균주 및 배지

공시균주는 본 연구실에서 분리 선정한 글루타민산 생산균주 *Brevibacterium flavum* nov. sp. D2209B[1]를 사용하였고 전배양배지 및 발효배지의 조성은 Table 1~2 와 같으며 발효배지의 각 성분이 L-GA 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 acetic acid, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $MnCl_2$, FeCl, NaCl, thiamine 및 biotin 등의 배지성분 농도를 각각 달리한 시험배지를 사용하였다.

전배양배지 및 발효배지는 각각 500 ml 용 후라스크에 30 ml 씩 분주하고 15 lb 에서 10분간 살균한 후 pH 7.2가 되도록 조절하였다.

Table 1. Medium for Seed Culture.

Sodium acetae	20 g
Ammonium acetate	20 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	10 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10 mg
NaCl	10 mg
Yeast ext.	2 g
Tap water	1,000 ml
pH	7.0—7.2

Table 2. Medium for L-Glutamate Accumulation.

Sodium acetate	20 g
Ammonium acetate	20 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	10 mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10 mg
NaCl	10 mg
Thiamine-HCl	100 μg
Biotin	0.3 μg
Distilled water	1,000 ml
pH	7.0—7.2

2. 실험방법

a. 발 효

공시균주 1백금니를 전배양배지에 이식하여 30 °C 에서 16시간 진탕배양한 다음 그 1.5 ml 를 발효배지에 이식하고 48 시간 발효후의 균체의 증식과 L-GA 생성을 비교하였다.

사용한 진탕배양기는 회전식이며 회전속도 200 rpm, 회전반경 1.6 cm 이다.

배양중에 있어서 배양액의 pH 를 12~16시간 간격으로 측정하고 pH 7.0~7.2 가 되도록 NH_4-acetate 17.4g, acetic acid 40 ml, 증류수 100ml 의 혼합용액을 feed 하여 조절하였다.

b. 균체량의 측정

발효액을 증류수로서 25배로 희석하여 560mμ에서의 optical density 를 측정하여 균체량으로 하였다.

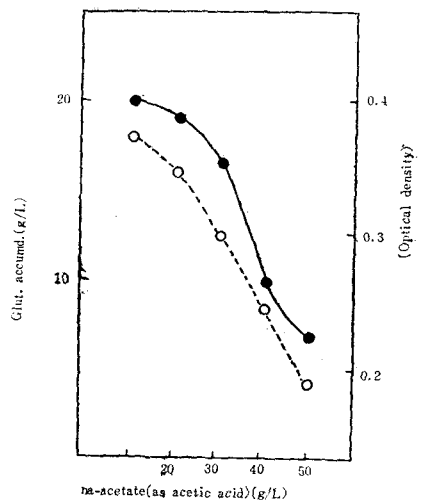
c. L-GA 의 분석

배양액을 원심분리하여 균체를 분리하고 그 상정액을 TLC 법으로 분석하였으며 동시에 L-GA 탈탄산효소를 이용한 검압법[2] 에 의한 분석법도 병행하였다.

결과 및 고찰

1. 초산농도에 의한 영향

초산농도가 L-GA 의 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배지 *l* 당 NH_4-acetate 를 20g (acetic acid 환산량)씩 일정하게 첨가하고 Na-acetate 를 10, 20, 30, 40 및 50 g (acetic acid 환산량)의 각 단계농도로 각각 첨가한 배지를 사용하여 발효한 결과 Fig. 1 과 같이 acetic acid 농도의 증가에 따라 증식 및 L-GA 생성이 저하되는 경향이며 *l* 당 50 g 이상의 농도에서는 증식이 현저하게 감소되고 30~40 g 의 농도에서 비교적 L-GA 생성이 좋았다. 이러한 결과는 초산농도의 증가로 인한 증식저해



Total acetate (as acetic acid) (g/L)

Fig 1. Effects of Na-Acetate on Growth (-○-) and L-Glutamate Accumlation (-●-). Cultured aerobically for 48 hours at 30°C.

작용으로 추측되며 角田등[3] 의 결과와 같은 경향이다.

NH_4-acetate 와 Na-acetate 의 혼합비에 따른 영향을 검토하기 위하여 NH_4-acetate 와 Na-acetate 의 혼합비가 0.5 : 3.5, 1.0 : 3.0, 1.5 : 2.5 및 2.0:1.0이 되도록한 각 배지의 acetate 총 첨가량이 l 당 20, 30 및 40 g(acetic acid 환산량)인 각 배지군을 사용하여 실험한 결과는 Table 3 과 같다.

Table 3. Effects of the Ratio of NH_4-Acetate to Na-Acetate on Growth and L-Glutamate Accumulation.

Total acetate (g/L)	Ritio of NH_4-acetate to Na-acetate	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
20	0.5/3.5	0.27	18.3
	1.0/3.0	0.29	18.9
	1.5/2.5	0.28	18.3
	2.0/2.0	0.27	18.0
30	0.5/3.5	0.28	18.0
	1.0/3.0	0.30	19.0
	1.5/2.5	0.30	20.1
	2.0/2.0	0.31	19.5
40	0.5/3.5	0.26	17.8
	1.0/3.0	0.30	18.2
	1.5/2.5	0.29	18.1
	2.0/2.0	0.29	18.7

Medium :KH_2PO_4, 1 g; $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5g; thiamine hydrochloride, 100 μg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg; NaCl, 10 mg per litre

Cultured for 48 hours at 30°C.

NH_4-acetate 와 Na-acetate 의 혼합비의 변화에 따른 명확한 경향은 볼 수 없으나 acetate 총첨가량이 증가될 수록 2.0:2.0 및 1.5:2.5 의 혼합비에 가까울 때 L-GA 의 생성이 증가하는 경향이며 또 초산농도는 l 당 20~30 g 일 때에 40 g 의 경우보다 L-GA 생성이 좋았다. 이 결과는 NH_4-acetate 와 Na-acetate 를 각각 10~14 g 씩 첨가하였을 때 L-GA 의 생성이 좋았다는 Phillips 등[4]의 특허내용과 비슷한 경향이나 NH_4-acetate 와 Na-acetate 를 각각 l 당 10 g 씩 첨가한 경우와 NH_4-acetate 15 g 과 Na-acetate 25 g 을 첨가한 경우를 비교하였을 때 초산농도의 증가로 L-GA 생성이 약 1/5로 감소한다는 Phillips[4] .의 결과와 같은 현저한 영향은 볼 수 없었으며 이는 사용균주의 생리적 성질의 차이에 의한 것으로 생각되며 본 실험에 사용한 균주는 초산에 대한 내성이 비교적 강한 것으로 생각된다.

2. 무기염류의 영향

KH_2PO_4, $MgSO_4$, $FeCl_3$ 및 NaCl 의 농도가 증식 및 L-GA 생성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Effects of Inorganic Salts:

KH_2PO_4

Concentration (g/L)	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
0	0.12	5.5
1.0	0.29	18.9
2.0	0.27	17.4
4.0	0.27	18.4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Concentration (g/L)	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
0	0.15	5.6
0.5	0.29	17.9
1.0	0.30	17.0

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$

Concentration (mg/L)	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
0	0.22	6.6
10	0.21	17.9
40	0.21	16.3

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$

Concentration (mg/L)	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
0	0.24	6.2
10	0.25	17.9
50	0.24	17.0

NaCl

Concentration (mg/L)	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
0	0.25	18.5
10	0.27	18.7
50	0.26	14.2

Cultured aerobically for 48 hours at 30°C.

KH_2PO_4 는 증식 및 L-GA 생성에 필수적으로 요

구되나 l 당 1~4 g의 농도범위에서는 거의 생성량의 차이를 볼 수 없으며 Tsunoda 등[5]의 결과와 유사하다. $MgSO_4$도 증식 및 L-GA 생성에 필수적으로 요구되나 첨가량의 차이에 의한 영향은 볼 수 없었다. 이 결과는 Tsunoda등[5]의 $MgSO_4$의 농도가 l 당 0.4 g인 경우보다 0.8 g일 경우 증식 및 L-GA 생성이 훨씬 좋았다는 결과와는 다른 경향이다.

Mn^{++}은 L-GA 생성에 필요하나 첨가량의 차이에 의한 뚜렷한 영향은 볼 수 없고 Fe^{+++}도 Mn^{++}과 같은 경향을 나타내었다.

Na^{+}의 첨가효과는 볼 수 없으며 증식 및 L-GA 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

3. 발육소의 영향

Brevib. flavum nov. sp. D2209B 균주는 Table 2의 발효배지에 yeast ext. 대신 biotin을 l 당 5 μg 첨가했을 때 증식은 좋으나 L-GA의 생성량은 현저하게 감소되므로 biotin과 thiamine의 첨가농도를 달리하여 이들 발육소의 글루타민산 생성에 미치는 영향을 본 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Effects of Concentrations of Biotin and Thiamine on the Growth and L-Glutamate Accumulation.

Thiamine hydrochloride (μg/L)	Biotin (μg/L)	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
0	0	0.19	18.0
	0.1	0.26	19.2
	0.2	0.29	19.3
	0.3	0.34	18.5
	1.0	0.52	6.0
50	0	0.21	18.5
	0.1	0.27	20.1
	0.2	0.30	20.8
	0.3	0.33	19.7
	1.0	0.50	6.2
100	0	0.20	18.5
	0.1	0.25	19.9
	0.2	0.31	21.0
	0.3	0.35	19.0
	1.0	0.51	5.7

Medium: Na-acetate 20 g; NH_4-acetate, 20 g; KH_2PO_4, 1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg; NaCl, 10 mg per litre. Cultured aerobically for 48 hours at 30°C.

Thiamine의 첨가로 균체의 증식 및 L-GA 생성이 약간 증가하는 경향이 있으나 뚜렷한 차이는 볼 수 없고 biotin의 첨가에 의하여 증식은 농도에 비례하여 현저하게 증가하는데 반하여 L-GA 생성은 오히려 저하되고 l 당 0.3μg 이하의 농도범위에서만 대량의 L-GA가 생성되며 l 당 0.1~0.2 μg의 biotin 농도가 L-GA 생성을 위한 최적농도임을 나타내고 있다. 이와같이 L-GA 생산균이 증식에 요구하는 biotin 양보다 낮은 biotin 결핍상태에 있어서 L-GA 생성량이 현저하게 증가하는 현상은 L-GA 생성능의 증대, L-GA의 균체성분에의 도입저하 및 L-GA의 세포외로의 분비증가 등에 기인된다는 당질을 탄소원으로한 木村등[6] 및 椎尾등[7]의 연구결과와 같은 이유에 의한 것으로 생각되며 당질을 탄소원으로 사용하는 경우의 biotion 최적농도는 l 당 약2~3μg[8,9]의 5 μg 이하인데 대하여 초산을 탄소원으로 할 경우 L-GA 생성 최적량은 약 1/10 정도로 감소되는 것으로 생각되며 l 당 0.2~0.5 μg의 농도가 L-GA 생성을 위한 최적량이라는 Tsunoda등[5]의 보고와 유사한 결과이다.

4. 온도의 영향

30°C 및 35°C에 있어서의 증식 및 L-GA 생성을 비교한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 배양온도 35°C 경우 30°C의 경우에 비하여 증식 및 L-GA 생성이 모두 저하하는 결과를 나타내어 당질을 탄소원으로 하는 경우와 같이 L-GA 생성을 위한 최적온도는 30°C인 것으로 생각된다.

Table 6. Effacts of Temperature on Growth and L-Glutamate Accumulation.

Temp. (°C)	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
30	0.28	18.6
35	0.25	13.9

Cultured for 48 hours at 30°C.

5. pH의 영향

발효중 pH는 상승되므로 12~16시간 간격으로 NH_4-acetate 17.4g, acetic acid 40ml, 증류수 100 ml의 혼합용액을 feed하여 pH를 7.0 및 8.0으로 각각 조절한 결과 Table 7에서 보는 바와 같이 pH 7.0 조절시에 L-GA의 생성량이 많았으나 본 실험은 후라스크를 이용하였으므로 정확히 한정된 범위에 계속 유지한다는 것이 불가능하며 pH 7.0으로 조절한 배지에서 L-GA의 생성이 좋은 것은

Table 7. Effects of pH on Growth and L-Glutamate Accumulation.

pH	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
7.0	0.38	19.6
8.0	0.40	15.0

Culture for 48 hours at 30°C.

최적 pH 범위 내에 유지되는 시간이 pH 8.0으로 조절한 배지에 비하여 길었다는 것을 뜻하므로 최적 pH는 7.5~8.5의 범위에 있는 것으로 추측된다.

6. Succinic acid 및 Malic acid의 영향

초산을 주 탄소원으로 하는 배지에 소량의 C_4 dicarboxylic acid를 첨가하므로서 L-GA의 생성이 촉진된다는 都河등의 특허[10]에 따라 발효배지에 0.2%의 succinic acid 및 malic acicd를 각각 첨가하여 무첨가시와 비교한 결과 Table 8에 표시한 바와 같이 이들의 첨가에 의해서 L-GA 생성은 증가되었으며 succinic acid 보다 malic acid가 더 효과적이었다. 이들 산의 첨가효과에 있어서 都河등[10]의 결과와는 약간의 차이가 있는 것 같으나 이것은 사용균주의 차이에 의한 것으로 생각된다.

Table 8. Effects of Addition of Succinic Acid and Malic Acid on Growth and L-Glutamate Accumulation.

Acids added (0.2%)	Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
None	0.29	18.2
Succinic acid	0.27	19.1
Malic acid	0.30	24.1

Cultured aerobically for 55 hours at 30°C

8. Penicillin의 영향

발효중 penicillin을 첨가함으로서 L-GA의 축적에 효과적이라는 Harada 등[11]의 보고에 따라 penicillin의 첨가농도 및 시간이 L-GA 생성에 미치는 영향을 보기 위하여 실험한 결과는 Table 9 및 10과 같다. penicillin의 첨가에 의해서 L-GA 생성은 현저하게 증가되고 첨가 최적시기는 배양시간 16시간이며 최적농도는 배지 ml당 20~50 unit임을 나타내고 있다. 이 결과를 이용하여 배지 ml당 20 unit의 penicillin을 16시간 배양후 첨가하였을 때의 증식 및 L-GA 생성의 경시적인 변화를 그림으로 표시하면 Fig. 2와 같다.

이상의 결과 penicillin의 첨가로 증식은 억제되

Table 9. Effects of Additional Times and Concentrations of Penicillin-G on Growth and L-Glutamate Accumulation.

Paniclin		Growth (O. D)	Glut. accumd. (g/L)
Conc. (u. /ml)	Additional time (hrs)		
0	—	0.66	1.2
20	8	0.12	10.2
20	12	0.14	22.8
50	12	0.16	22.8
20	16	0.25	23.6
50	16	0.29	23.4
20	20	0.38	10.2
50	20	0.27	12.1
100	20	0.18	14.7
20	24	0.40	10.2
50	24	0.32	11.4
100	24	0.18	12.1

Medium: Na-acetate, 20 g: NH_4-acetate, 20 g; KH_2PO_4 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10mg $FeCl_3$, $6H_20$. 10mg; NaCl, 10 mg; Yeast ext · 2g per litre. Cultured 60 hours at 30 °C.

Tabla. 10. Effects of Concentrations of Penicillin-G on Growth and L-Glutamate Accumulation.

Concentrations of penicillin (u. /ml)	Growth (O. D)	Glut. accumd (g/L)
0	0.66	1.2
5	0.55	1.8
10	0.42	10.2
20	0.25	23.6
50	0.20	23.4
100	0.18	15.2
200	0.16	14.7

Medium: Na-accetate, 20 g: NH_4-acetate, 20 g; KH_2PO_4, 1 g : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg; NaCl, 10 mg; Yeast ext. 2g. per litre.

Penicillin-G was added at 16 hours incubation time.

Cultured for 60 hours at 30°C.

며 첨가량의 증가나 첨가시기가 빠를 수록 억제효과는 크고 증식억제의 정도에 따라 L-GA의 생성은 다르며 증식이 적당히 억제되었을 때 가장 좋다는 것을 알 수 있다. L-GA의 발효에 있어서 penicillin 첨가가 L-GA의 생성을 증가내지 촉진하는 이유로서 세포외로부터 세포내로의 L-GA의 투과저해[12], 균체내 결합형 L-GA 생성에 대한 저해[13], 세포벽 형성에 대한 저해[14,15], 균체외로의 L-GA 분

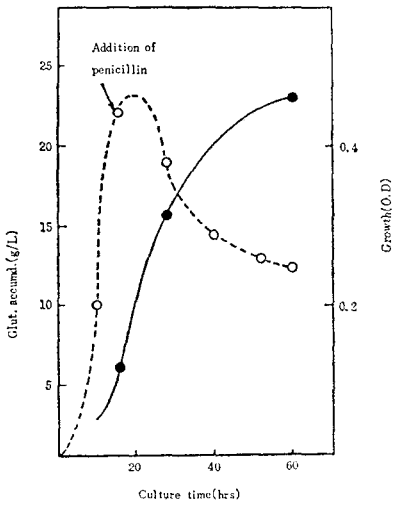


Fig 2. Time course of Growth (—○—) and L-Glutamate Accumulation (—●—)in the Presense of Panicillin.

20u. penicillin G/ml was added at 16 hours incubation time.

Medium: Na-acetate, 20 g: NH_4-acetate. 20 g: KH_2PO_4, 1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg: NaCl, 10 mg; Yeast ext. 2 g per litre.

피의 촉진[16] 등이 설명되고 있으며 이들은 모두 당질을 탄소원으로한 연구결과이나 Harada등[11]은 초산을 탄소원으로 하였을 때에도 penicillin 첨가가 L-GA 생성에 효과적이라고 보고하고 있으므로 초산을 탄소원으로한 발효에 있어서도 penicillin 첨가는 같은 효과를 나타내는 것으로 생각된다. Harada 등[11]의 보고에 의하면 penicillin 첨가 의최적시간이 24시간인데 대하여 본 실험에 있어서는 16시간인 것은 사용균주의 증식속도의 차이에 기인되는 것으로 추측된다.

8. 전배양의 영향

전배양의 시간이 본 발효에 있어서 증식 및 L-GA 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 종균을 16, 20 및 24시간 각각 전배양한 후 본발효배지에 식균배양하여 비교한 결과 Table 11에서 보는 바와 같이 16~20시간 전배양하였을 때 L-GA의 생성이 좋으며 그 이상의 전배양시간의 연장은 균체량이 증가되어 본 발효배지에 식균하는 균체량이 실질적으로 증가되는 데도 불구하고 L-GA 생성은 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 현상은 전배양의 증식단계에 있어서 대수기의 초기내지 중기의 균체가 L-GA 생성을 위해서 생리적으로 적합한 상태에 있는 것으로 생각된다.

Table 11. Effects of Incubation Time for Seed on L-Glutamate Accumulation.

Seed		Glut. accumd. (g./L)
Incubation time (hrs)	Growth (O. D)	
16	0.16	23.6
20	0.37	23.2
24	0.50	28.8

Medium for seed culture: Na-acetate, 20g; NH_4-acetate, 20g; KH_2PO_4, 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg; NaCl, 10 mg; Yeast ext., 2g per litre.

Cultured for 55 hours at 30 °C.

요 약

초산으로 부터의 글루타민산 발효생성을 목적으로 *Brevibacterium flavum* nov. sp. D2209B 균주를 이용한 발효조건에 관하여 시험 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 초산농도는 배지 *l* 당 30 g 이하일 때 L-GA 생성이 좋았다.

2. KH_2PO_4, $MgSO_4$, $FeCl_3$, $MnCl_2$ 및 NaCl등의 무기염류의 첨가는 L-GA 생성을 위하여 필수적이며 이들 무기염의 농도차에 의한 현저한 영향은 볼 수 없었다.

3. Biotin의 농도는 *l* 당 0.3r 이하의 한정된 범위에서 L-GA 생성이 가장 좋았다.

4. L-GA 생성을 위한 최적온도는 30°C 이며 최적 pH는 7.5~8.5 였다.

5. Succinic acid 와 malic acid의 첨가로 L-GA 생성은 증가되었다.

6. 배양도중에 있어서의 penicillin 첨가는 L-GA 생성을 촉진하며 발효 16시간째 배지 *l* 당 20 unit를 첨가하였을 때 가장 효과적이였다.

7. 전배양시간은 16~20시간 배양이 가장 적당하였다.

참 고 문 헌

1) 河德模, 盧完燮 · 産微誌 **2**, 103(1974)

2) Umbreit, W.W., R.H. Burris and J.F. Staffer: "Manometric Techniques", 207(1959)

3) Tsunoda, T., I. Siio and K. Mitsugi: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 18(1961)

4) Phillips, U.A.: U.S. Patent, 3, 227, 725(1963)

5) Tsunoda, T., I. shiio and K. Mitsugi: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**. 30(1961)
6) 木村一雄：*Amino Acids*, **8**, 51(1968)
7) 椎尾勇：*J. Biochem.*, **51**, 56(1962)
8) 田中勝宜，岩崎彪，木下祝郎：日農化誌，**34**, 593(1960)
9) 田中勝宜，秋田定夫，木村一夫，木下祝郎：日農化誌 **34**, 600(1960)
10) 都河龍一郎，奥村信二，黒沼秀雄：日本特許，45—2670(1970)
11) Harada, T., K. Seto and Y. Murooka: *J. Ferment. Technol.*, Japan, **46**, 169(1968)
12) Gale., E.F.: *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 34(1947)
13) 椎尾勇：*J. Biochem.*, **52**, 108(1962)
14) Robert, J.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **59**, 458(1962)
15) Waglie, E.B.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **59.**, 450(1962)
16) Wyss, O., G.N. Smith, G. L. Hobby, E.L. Oginsky, and R. Pratt: *Bact. Revs.*, **17**, 17 (1953)