

人蔘 Saponin이 微生物의 酵素活性에 미치는 영향

趙 成 桓·趙 漢 玉·朴 洪 球

世 宗 大 學

(1979년 11월 6일 접수)

The Effect of Ginseng Saponins on Microbial Enzyme Activity

Sung-Hwan Cho · Han-Ok Cho and Hong-Koo Park

King Sejong University, Seoul, Korea

(Received November 6, 1979)

Abstract

In order to investigate biochemical effects of ginseng saponin on microbial enzyme activity, *Aspergillus oryzae*-143 and *Aspergillus niger*-40, which were selected from various sources of samples and were the highest enzyme producing mold strains, were grown in the medium containing various saponin concentration (0mg%, 10mg%, 50mg%, 100mg%, 150mg% and 300mg%). The enzyme activity (amylase, protease) was found most active when the saponin was added in the culture media with the concentration of 10mg%~100mg%. But it seemed that the action of microbial enzyme was inhibited by adding more than 300mg% of saponin.

I. 緒 論

人蔘 saponin이 dammarane系 glycoside의 혼합물로 밝혀진 이후 人蔘成分의 화학구조 및 그 藥理作用과 生理作用에 대하여 많은 연구결과가 발표되었지만, 아직도 人蔘의 有効成分의 本質은 명확하게 규명되고 있지 않다. 人蔘의 藥効는 人蔘성분이 대사반응에 직접 또는 간접으로 작용한 결과 나타나는 현상에 불과하기 때문에 人蔘의 有効성분의 本질과 그 약리 및 생리작용을 밝히기 위해서는 人蔘성분이 生化學的 反應系에 어떠한 영향을 미치는가를 연구할 필요가 있다. 그러한 의미에서 人蔘成分이 酵素活性에 미치는 영향을 검토·규명해야 하며, 人蔘중에 어떤 성분이 이 반응을 활성화한다면, 이 반응활성을 指標로 하여 그 성분을 분리하고 그것으로 여러가지 임상실험을 이행하여 이미 알려진 藥効와 비교·검토한 후, 그 성분의 構造決定에 입하는 것이 人蔘유효성분연구의 첩경이라 생각된다. 이러한 관점에서 시도된 人蔘의 생화학적 측면의 연구¹⁻¹¹⁾가 진행되어 왔으나, 식품산업에 이용되는

미생물의 분비효소가 인삼성분에 의하여 어떻게 활성화되는지에 관한 연구보고는 별로 없었다. 따라서 本實驗에서는 人蔘抽出物이 효소활성에 미치는 영향을 실험하여 酵素加工이 주축이 되고 있는 식품산업에 인삼성분의 적용여부를 알아보기 위한 기초실험을 실시하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 人蔘根 saponin의 조제

前報¹²⁾의 方法에 準하여 抽出・調製하였다(Fig. 1). 즉, Shibata^{13,14)}와 Kim¹⁵⁾ 등의 方法을 變形시켜 조제한 n-butanol-soluble saponin 5g을 活性炭으로 脫色시킨 다음, 減壓乾固하여 얻어진 微黃色殘渣를 증류수에 녹여 DEAE-cellulose column(2.2×30cm)에 加하고 pH 8.0의 0.05M Tris buffer와 pH 11.0 0.05M carbonate buffer를 사용하여 stepwise로 전개시키면서 그 溶出液을 absorbance monitor(ISCO Model UA-5)가 부착되어 있는 automatic fraction collector(Buchler Fracto Mette 200, U.S.A.)를 사용하여 5ml씩 받았다. UV monitoring system을 사용하여 280nm에서 연속적으로 용출액의 吸光度를 기록하였으며 各 分劃別로 모아 Libermann Buchard test¹⁶⁾를 실시한 후, 冷凍乾燥하여 methanol에 녹이고 여과하여 시료중에 함유되어 있는 Na₂CO₃, NaHCO₃, 糖類等を 제거하고 減壓濃縮하는 조작을 반복하여 saponin을 얻어 냈으며, 本 실험에서는 더 이상 정제하지 않고 실험용 saponin

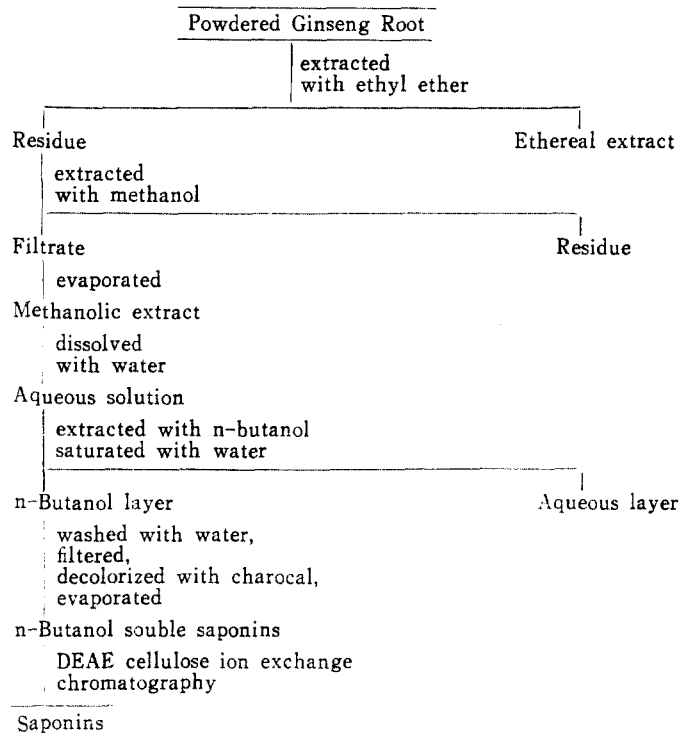


Fig. 1. Extraction and separation of saponins from *Panax ginseng*

시료로 사용하였다.

2. 조제 saponin의 densitogram 및 IR spectra

前報¹²⁾에 準하여 실시하였다.

3. 酵素실험에 이용한 균주의 분리 및 同定

장류, 부식목, 볏짚등 균주분리용 시료에서 1g을 취하여 screw capped test tube에 넣고 멸균수 10ml를 가한 후 흔들어서 현탁액을 만들고, 이 현탁액 1ml를 건열 살균한 petri dish에 滴下하고, Table 1과 같은 배지 및 배양조건으로서 미생물을 배양하였다.

Table 1. The medium for isolation of microorganisms

Constituent	Amount
Dextrose	10g
Peptone	5g
KH ₂ PO ₄	1g
NaCl	2%
Rosebengal	1:30, 000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
Streptomycin	30μg/ml
Distilled water	1L
Agar	2%
Saponin	50mg%

Incubated for 3-5 days at 30°C

순수분리한 총 110여개의 菌株에 대하여 amylase 및 protease activity가 우수한 균주를 선발하였다.

1) 1次 screening

酵素液의 조제는 대형시험관(직경 2cm, 길이 18cm)에 밀기울 3g과 同量의 수도수를 가하여 加壓殺菌한 다음, 分離菌株를 접종하여 4일간 培養하고 여기에 15ml의 증류수를 가하여 냉장고안에서 하룻밤 침출한 액을 粗酵素液으로 하였다. Table 2와 같은 基質을 petri dish에 20ml씩 注加한 plate에 酵素液 2白金耳를 disk paper를 사용하여 作用시켜 37°C에서 20시간 효소반응시킨후 disk paper를 제거하고 1% casein agar plate에는 10% T.C.A.를 5ml 加하고, 1% starch agar plate에는 0.01N iodine solution 5ml를 가하여 투명하고 直徑의 크기가 큰 環을 나타내는 菌株를 分離하여 1次 screening하였다.

2) 2次 screening

Table 2. Composition of substrate for screening of enzyme activity

Substrate for protease activity		Substrate for amylase activity	
Casein	1%	Soluble starch	1%
McIlvain buffer pH5.4,	20ml	McIlvaine buffer pH5.4,	20ml
Agar	2%	Agar	2%
Distilled water	80ml	Distilled water	80ml

上記한 基質 plate에 stainless cup을 사용하여 酵素液 0.2ml씩 작용시켜 37°C에서 5시간 반응시키고 以後의 過程은 1次 screening과 같은 方法으로하여 環의 크기가 2cm정도되고 環의 鮮明도가 우수한 菌株를 분리하여 2次 screening하였다.

3) 우수균주의 동정

2次 screening하여 選定된 효소활성이 우수한 菌株를 The Genus *Aspergillus*¹⁷⁾에 準하여 同定하였다.

4. 人蔘 saponin添加培地에서 培養된 微生物의 酵素實驗

1) 우수선발균주의 효소특성

효소작용에 대한 最適 pH條件을 알아보기 위하여 밀기울에, 증류수대신 McIlvaine buffer (pH3~9)를 가하여 배양하고 各各의 酵素力價를 측정하였다.

2) 酵素液의 調製

前述한 方法에 의하여 조제한 saponin을 수도수에 용해시켜 0mg%(saponin을 첨가하지 않은 對照區), 10mg%, 50mg%, 100mg%, 150mg%, 300mg% saponin 용액을 만들고, 이 용액 14ml씩을 각각 風乾狀態의 밀기울 20g에 넣어 잘 混合하고 蒸餾殺菌한 다음, 前記한 바와 같이 分離·選拔한 菌株를 接種하여 30°C에서 3일간 배양하여 밀기울 Koji를 제조하였다. 이 밀기울 koji 10g을 mortar에 넣어 잘 粉碎하고 250ml 삼각 flask에 옮긴 다음, 1%식염수 100ml와 toluol 1ml를 넣고, 냉장고내에서 가끔 교반하여 주면서 하룻밤 浸出한 濾液을 酵素液으로 하였다.

3) enzyme activity의 測定

i) dextrogenic activity

Wohlgemuth法¹⁸⁾에 準하여 測定하였다. 즉, 1列의 시험관에 미리 증류수 1ml씩을 넣고 1번시험관에 효소액 1ml를 가하여 잘 혼합한 후, 그 1ml를 2번시험관에 옮기는 操作을 이어나가, 시험관 중의 효소농도가 차례로 반감되게 한 다음, 시험관을 40°C water bath에 넣어 豫熱하고 이것에 40°C water bath에서 예열해 둔 1% soluble starch 5ml씩을 가하면서 흔들어 주고 40°C water bath에 넣어 정확히 30분간 反應시킨다. 반응후 곧 시험관을 冷水中에 넣어 냉각시키고 0.01N iodine 0.5ml를 가하여 呈色을 관찰하였다. 反應液의 iodo-starch呈色이 紫赤色으로 되는 점을 기준으로 하여 enzyme solution 1ml가 40°C, 30분간에 분해할 수 있는 1% soluble starch液의 ml數로 酵素力價를 표시하였다.

ii) saccharogenic activity

糖化力測定法¹⁹⁾에 準하였다. 즉, 2% soluble starch 20ml, 인산완충액(pH 5.0 또는 pH 7.0) 2ml 및 증류수 2ml를 100ml의 삼각 flask에 넣고 toluol을 0.2ml 첨가하여 cork 栓을 하고, 미리 30°C의 water bath에 20분정도 보존하였다가 효소액 2ml를 재빨리 注加하여 잘 混和하고, 곧 作用混液 2ml를 採取하고 Fehling-Lehmann-Schoorl試藥의 B液중에 投入하여 효소작용을 막고 그 還元力을 측정하고, 이를 標準曲線에서 glucose mg으로 환산 산출하여 G₀值로 하고, 30분후에 2ml를 採取하여 그 환원력을 glucose mg으로 산출한 것을

G_{30} 值로 해서 다음과 같은 式으로 부터 糖化率을 계산하였다.

$$\text{糖化率(\%)} = \frac{G_{30} - G_0}{34.2} \times 100$$

단, 34.2는 작용혼액 2ml중에서 최초로 존재하는 soluble starch의 glucose當量(mg)이다.
iii) protease activity

Modified Folin法^{20,21,22})에 의하여 protease activity를 측정하였다. 즉, 酵素液을 다시 5배로 희석한 뒤, 아 효소액 1ml에 M/25 phosphate buffer (pH6 또는 pH 7.0)에 녹인 0.6% casein substrate를 5ml 넣어 30°C water bath에서 정확히 10분간 반응시킨 뒤 蛋白質沈澱劑인 0.4M TCA 5ml를 넣어 반응을 중지시키고 30분간 침전을 完結시킨다음 여과하여 그 濾液中 2ml에 Na_2CO_3 5ml와 3배 희석시킨 Folin시약 1ml를 가해 發色시킨 뒤, 30분후 Spectronic 20로써 660nm에서 O.D.값을 측정하고, 이 값에서 효소액을 넣지 않고 上記와 같이 반응시킨 Blank의 O.D.값을 뺀 값으로 標準曲線(Fig. 2)을 읽어 희석배수를 곱해 주고 환산하여 protease activity unit로 表示하였다.

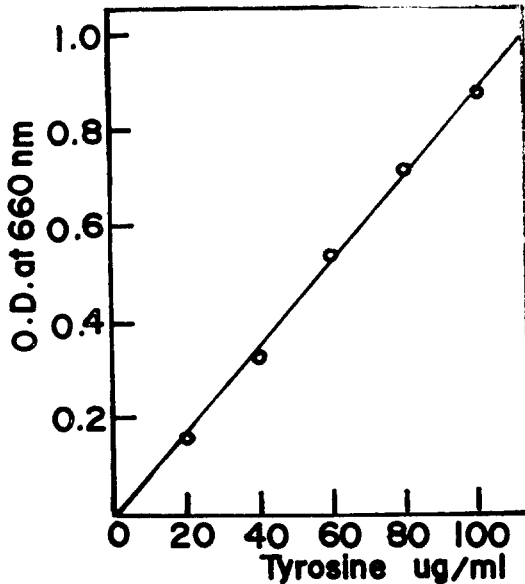


Fig. 2. Standard curve of optical density versus concentration of tyrosine

III. 結果 및 考察

1. 調製 saponin의 理化學的 特性

활성탄으로 脫色시킨 *n*-butanol soluble saponin을 加하고, tris buffer와 carbonate buffer를 사용하여 DEAE-cellulose ion exchange chromatography를 행하고 5ml씩 용출액을 받았다. *n*-butanol soluble saponin의 UV spectrum을 보면 거의 모든 자외선 범위에 걸쳐 광범위한 吸光度를 나타냄으로 溶出液에 포함된 人蔘 saponin의 含量과 吸光度와의 相對的인 관계를 알아보기 위하여 fraction collector에 UV monitoring system을 附着하여 280nm에서

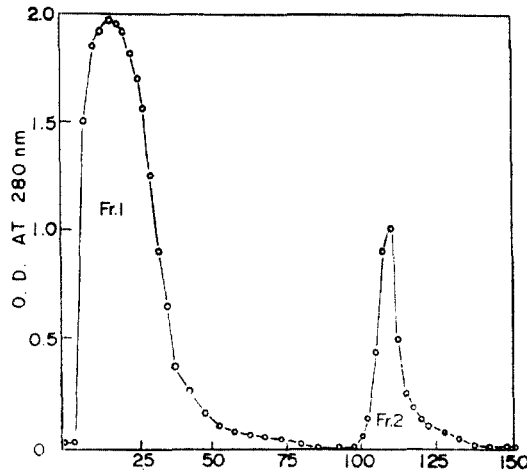


Fig. 3. DEAE cellulose ion exchange chromatography of ginseng saponins

그 吸光度를 연속적으로 記錄하였다. 이때 그려진 各 tube溶出液의 吸光度는 Fig. 3과 같고, 이 곡선에서 2개의 큰 劃分(Fr. 1 및 Fr. 2)을 얻을 수 있어 各 劃分에 해당하는 fraction tubes를 모아 冷凍乾燥한 後, 불순물을 제거하고 減壓濃縮하여 Fr. 1에서 1,250mg, Fr. 2에서 230mg의 殘渣를 얻을 수 있었다. Fr. 1은 Libermann Buchard test에 陽性反應을 보였으나, Fr. 2.는 陰性反應을 나타내었다.

한편, 前述한 方法에 의하여 조제한 劃分中 Fr. 1의 saponins을 chloroform-methanol-H₂O (65:35:10, lower layer)溶媒系로 1次展開하고, 3% CeSO₄로 發色시킨 thin layer chromatogram을 digital densitrol DMU-33C에 걸어 만든 densitogram은 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 本實驗에서 사용한 saponins은 panaxaxadiol系 saponin(K-1~K-5)과

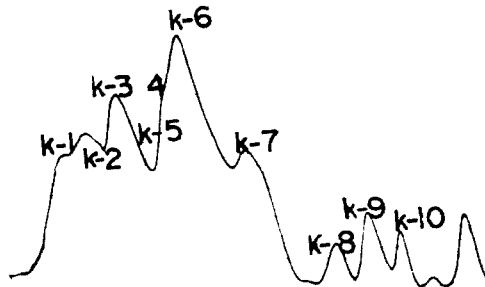


Fig. 4. Densitogram of saponins plotted by using digital densitrol DMU-33C

panaxatriol系 saponin(K-6 & K-7)의 비율이 1.8 : 1이었다. 아울러, 各 劃分의 IR spectra는 Fig. 5 및 Fig. 6과 같다. 두분획의 IR spectra는 다소 相異한 pattern을 보여 주고 있으며, Libermann Buchard test에 陽性反應을 보인 Fr. 1은 前報¹²⁾에서와 같은 理化學的反應實驗 結果, saponin fraction임을 同定할 수 있는데 반하여, Fr. 2는 확인할 수 없는 劃分의 化合物이었으므로 本實驗의 saponin試料로는 Fr. 1만을 사용하였다.



Fig. 5. Infra red spectra of ginseng saponins (Fr. 1)

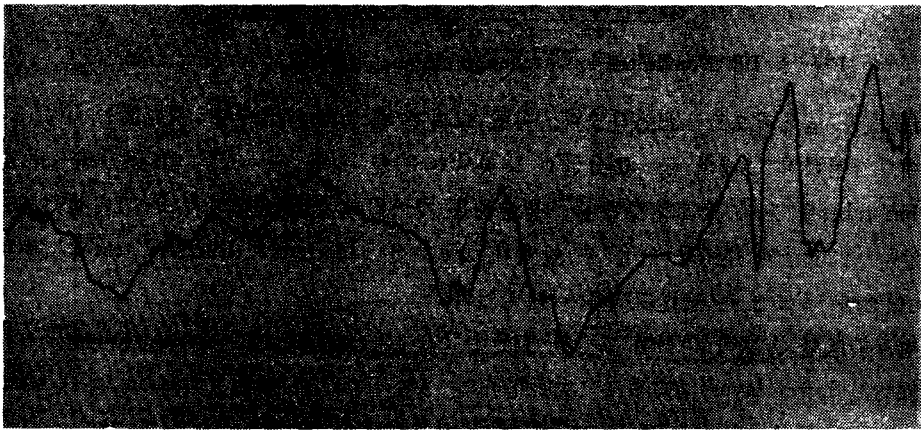


Fig. 6. Infra red spectra of ginseng saponins (Fr. 2)

2. 酵素活性이 優秀한 菌株의 分離 및 同定

장류, 부식목, 볏짚 등에서 순수분리한 균주중, amylase activity 및 protease activity가 강한 곰팡이 2菌株을 선발하였다. 選定된 균주의 형태학적 특성은 Table 3과 같으며, *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus niger*에 해당하므로 *Aspergillus oryzae*-143 및 *Aspergillus niger*-40으로 同定되었다.

3. 優秀選拔菌株의 酵素特性

選定된 優秀菌株 *Aspergillus oryzae*-143 및 *Aspergillus niger*-40이 培養最適條件에서 生成한 酵素의 最適 pH를 알아보기 위하여 각각 다른 pH에서 작용시켜 같이 酵素力價를 비교한 바, 그 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8과 같다. 두균주의 saccharogenic activity는 pH에 따라 다소 다른 경향을 나타내 보였는데, *Aspergillus oryzae*-143은 pH 7.0부근에서 최고의 活性을 보인 반면, *Aspergillus niger*-40은 pH가 酸性쪽으로 치우쳐진 pH 5.0에서 酵素力價가 가장 높았다. 산성 부근에서 *Aspergillus niger*-40은 비교적 높은 力價를 보여 주었고, 培地의 液性이 알칼리성으로 갈수록 급격히 그 효소역가가 감소하였다.

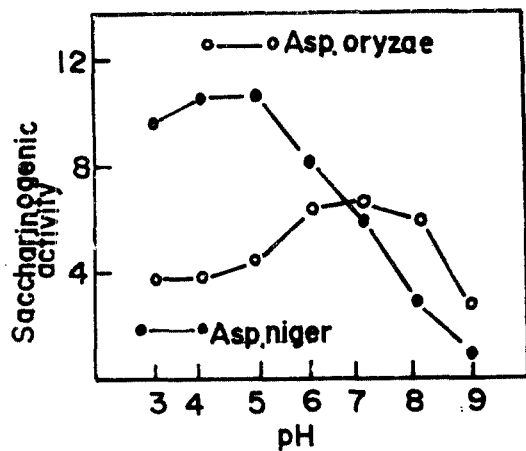
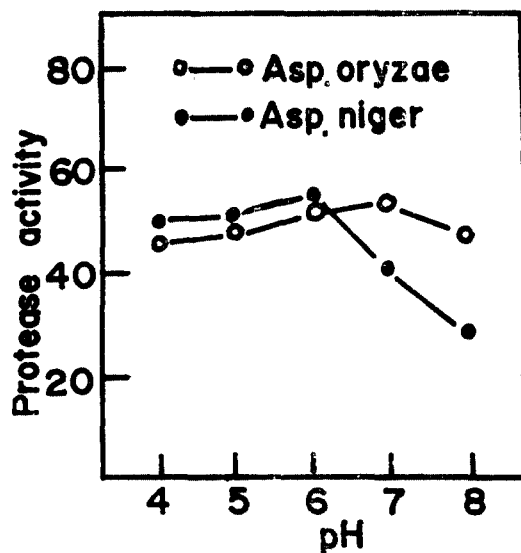
한편, protease activity는 pH別로 菌株間에 커다란 차이를 보이고 있지 않으며, *Aspergillus*

Table 3. Description of selected mold strain*

Morphological character		<i>Aspergillus oryzae</i> -143	<i>Aspergillus niger</i> -40
colony	rate of growth	rapidly spreading	slowly spreading
character	texture	loosely velvety	roughly velvety
	color above	definitely green	carbon black
	reverse	light brown	orange
colonial	color	green	carbon black
head	shape	radiate	globose
conidiophore	color	colorless	pale brown
	width	10~20 μ	9~18 μ
	length	2~4.5mm	3.5~4.0mm
	marking	rough	smooth
vesicle	origin	substratum	mostly substratum
	shape	globose	flask or globose
	size	30~50 μ	20~40 μ
	color	yellowish	pale brown
sterigmata	length	10~15 μ	10 μ
	width	3~5 μ	4 μ
conidia	color	yellowish	pale dark brown
	shape	globose	globose
	size	4~10 μ	4~5 μ
	marking	smooth	rough
perithecia		not produced	not produced
ascospore		not produced	not produced

*Medium: Czapek's agar (pH5.6)

Incubation: 6 days at 30°C

Fig. 7. Effect of pH on saccharogenic activity of *A. oryzae* and *A. niger*Fig. 8. Effect of pH on protease activity of *A. oryzae* and *A. niger*

niger-40의 protease activity는 saccharogenic activity에서의 마찬가지로 알칼리성쪽에서는 그 力價가 급격히 감소하였다.

4. 人蔘 saponin이 微生物의 酵素活性에 미치는 영향

최근 人蔘 saponins이 酵素反應에 영향을 주는 mechanism을 규명하려는 의도하에 生理學的 및 生化學的 研究가 활발히 進行되고 있으며, 이것을 토대로 하여 saponins이 微生物生育에 미치는 영향에 관한 실험보고들도 다소 발표되고 있다. Perepelitsa²³⁾ 등은 *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ustrectus* 등이 생산하는 複合酵素液을 saponin溶液에 첨가하면 saponins이 부분적으로 가수분해된다고 발표하였고, *Alternaria*는 saponins을 분해하여 CO₂와 H₂O를 生成하며, 그에 따라 微生物의 成長이 크게 촉진되었다고 報告하였다.

本實驗에서 選拔한 菌株를, saponin농도가 다른 밀기울배지에서 30°C의 온도로 3일간 培養하고, 各菌株가 生成하는 dextrogenic amylase를 各균주의 最適 pH條件 즉, *Aspergillus oryzae*-143은 pH 7.0, *Aspergillus niger*-40은 pH5.0에서 soluble starch에 작용시켜 그 酵素活性을 測定한 결과는 Fig. 9.와 같다. 즉, *Aspergillus oryzae*-143의 酵素力價는 全試驗區에서 *Aspergillus niger*-40에 비하여 비교적 높은 값을 보이고 있으며 saponin농도별로 볼 때, *Aspergillus oryzae*-143은 saponin농도가 10mg%인 배지에서 生育되었을 때 酵素活性이 가장 높고(대조구의 4배이상), 그이상의 농도에서는 급격하게 감소하여 150~300 mg%에서는 對照區(saponins을 첨가하지 않은 試驗區)와 거의 같은 活性을 나타내었다. *Aspergillus niger*-40은 50~100mg% saponin농도의 배지에서 자란 균주가 生成하는 효소의 力價가 가장 높은 活性值를 보였으며 이 菌株도 150~300mg%에서는 對照區와 별다른 차이를 보이지 않았다. 아울러, dextrogenic amylase의 酵素活性을 측정하는 조건과 同一한 pH

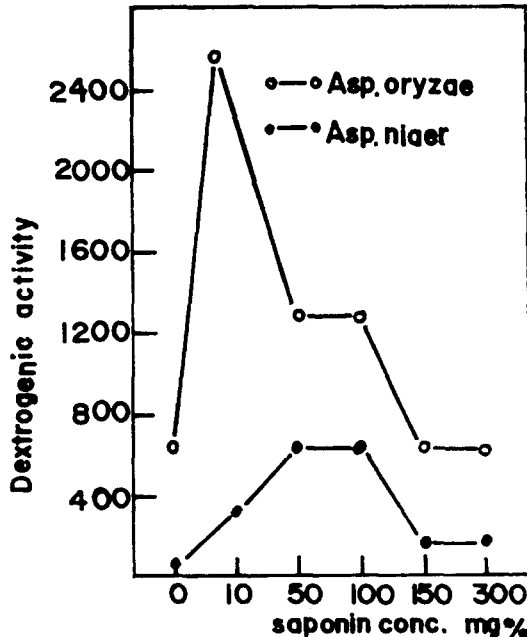


Fig. 9. Effect of saponin on dextrogenic activity of *A. oryzae* and *A. niger*

의 soluble starch에 saponin농도가 다른 培地上에서 生育한 菌株가 生成한 saccharogenic amylase의 糖化率은 Fig. 10과 같다.

즉, *Aspergillus oryzae*-143은 낮은 saponin농도에서는 saponins이 酵素活性에 그다지 영향을 미치지 않는 것으로 보였으나, saponin농도가 증가함에 따라, 점차 酵素力價도 증가하는 경향을 보이다가 saponin농도가 150mg%에서 자란 菌株가 生成하는 酵素試驗區에서

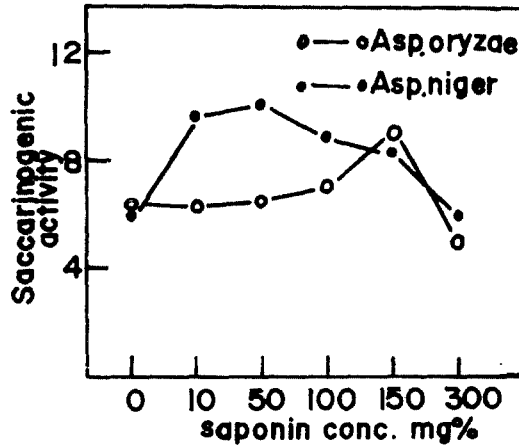


Fig. 10. Effect of saponin on saccharogenic activity of *A. oryzae* and *A. niger*

最高의 活性을 나타내었다. 그러나, saponin농도가 300mg%로 높아지면서 酵素活性은 도리어 抑制·減少되는 경향을 보이기 시작하였다. 이에 반하여 *Aspergillus niger*-40은 낮은 농도로 saponin이 첨가된 培地에서 生育된 菌株가 분비하는 酵素의 活性이 對照區보다 더 높은 경향을 나타내어, 50mg% saponin농도에서 가장 높은 活性을 보였다. saponin농도가 100mg%以上の 試驗區에서는 농도가 증가함에 따라 그 力價가 점차 減少하였으며 300mg%以上の 농도시험구에서는 오히려 對照區보다 그 酵素活性이 더 抑制될 것으로 豫想된다.

한편, Fig. 11에서 보는 바와 같이, protease activity는 *Aspergillus oryzae*-143은 10mg% 試驗區에서 그 酵素活性이 最大가 되고, 이때 活性度는 對照區보다 1.2배정도 크고, 50mg%

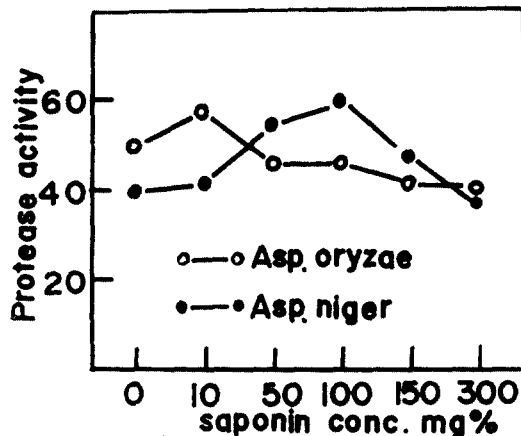


Fig. 11. Effect of saponin on protease activity of *A. oryzae* and *A. niger*

以上の saponin농도에서는 다소 微生物의 protease生成能이 抑制되는 듯하였다. *Aspergillus niger*-40의 경우, 첨가되는 saponin농도가 100mg%까지는 계속 酵素力價가 증가하였고, 100mg% saponin농도에서 對照區보다 1.5배정도로 最高의 活性을 나타내었다.

以上の 實驗結果에서 人蔘 saponin이 첨가된 培地에서 成長한 微生物의 酵素活性에 미치는 영향을 綜合·檢討해 볼 때, 菌種과 酵素種에 따라 多少 差異는 보였으나, 一般的으로 saponin농도가 10mg%~100mg% 첨가된 배지에서 微生物을 生育할 경우, 그들 微生物이 분비하는 extracellular enzyme의 活性이 촉진되는 것을 알 수 있으며, 이것은 Joo等²⁴⁾이 人蔘根 saponin농도가 10⁻³%~10⁻²%인 기초배지에서 *E. coli*를 生育하면 지질, 단백질, 핵산의 합성이 촉진되고 그 결과, 微生物細胞의 成長도 촉진되었다고 발표한 報告와 一致하는 結果이다.

물론, 앞으로도 계속해서 여러가지 生化學的 機能및 作用을 가진 微生物酵素들을 이용하여 人蔘 saponin이 그들 미생물의 효소작용에 미치는 영향및 기작을 더욱 더 규명할 필요가 있을 것이며, saponin이외의 人蔘有效成分에 대해서도 이와 관련된 기초연구가 실시되어야 될 것으로 생각한다.

IV. 要 約

人蔘根을 ether,, methanol 및 *n*-butanol로 연속추출하여 얻어낸 液 saponin溶液으로 liquid chromatography를 행하여 saponin을 分離하고, 이것을 添加한 培地上에서, 酵素活性이 優秀한 것으로 分離·同定된 菌株를 배양하여, 人蔘 saponin이 微生物의 酵素活性에 미치는 영향을 관찰하였다.

分離·同定한 곰팡이 *Aspergillus oryzae*-143와 *Aspergillus niger*-40는 적당량(10mg%~100mg%)의 人蔘 saponin이 첨가된 배지상에서 生育되었을 때, 그들이 生成하는 酵素活性은 촉진되었고, 高濃度의 saponin첨가배지에서는 오히려 酵素作用이 抑制되었다.

參 考 文 獻

1. Joo, C.N., Choi, I.S., Lee, S.J., Cho, S.H. and M.H. Son: *Korean Biochem. J.*, 6(3), 185(1973)
2. Joo, C.N., Choi, R.S., Chung, R.P., Lee, S.J. and O.H. Kim: *Korean Biochem. J.*, 7(1), 75 (1974)
3. Joo, C.N. and S.J. Lee: *Korean Biochem. J.*, 10, 59(1977)
4. Kim, H.K., Cho, Y.H. and S.J. Shinn: *Korean Biochem. J.*, 7(2), 167(1974)
5. Kim, T.B., Kim, C.K. and K.B. Lee: *Korean Biochem. J.*, 3, 41 (1970)
6. Kim, T.B., Kim, C.K. and K.B. Lee: *Korean Biochem. J.*, 5(2), 61 (1972)
7. Lee, K.S.: *Proc. International Ginseng Symposium*. The Central Research Institute, Office of Monopoly, Sam-wha Printing Co., Seoul, p. 57 (1974)
8. Shin, Y.C. and S.W. Kim: *Soul Uidae Chapchi* 13(2), 71 (1972)

9. You, S.Y.: *Soul Uidae Chapchi* 12(3), 173 (1971)
10. Lim, J.K., Park, C.W., Kim, M.S. and S.Y. You: *Korean J. pharmacol.* 6(2), 65 (1970)
11. Hiai, S., H. Oura, K. Tuskada, and Y. Hirai: *Chem. Pharm. Bull.* 19, 1656 (1971)
12. Cho, H.O., Cho. S.H., and S.J. Kim: *J. Korean Agricultural Chemical Society*, 22(1), 10(1979)
13. Shibata, S: *Tampaku-Shitsu, Kakusan, Koso* 2(1), 32 (1967)
14. Ando, T., Tanaka, O., and S. Shibata: *Syoyakugaku Zasshi* 25(1), 28 (1971)
15. Kim, J.Y. and E.J. Staba: *Kor. J. Pharmacog.* 4(4), 193 (1973)
16. George Rendina: *Experimental Methods in Modern Biochemistry* (Saunders Co.) p.172 (1972)
17. Raper, K.B., Fennel, D.I.: *The Genus Aspergillus*(The Williams & Wilkins Co., Baltimore)(1965)
18. 小卷: 醸酵協 16, 550 (1958)
19. 赤堀: 酵素研究法(Ⅱ朝倉書店) p.108 (1956)
20. Anson, M.L.: *J. Gen. Physical.* 22, 79 (1938)
21. 萩原, 赤堀: 酵素研究法 II, (朝倉書店) p.240. (1956)
22. Folin, O. and V. Ciocalteu: *J. Biol. Chem.* 73, 627 (1949)
23. Perepelitsa, E.D. and P.N. Razumovskii: *Izv. Akad. Nauk. Mold. SSR, Ser. Biol. Khim. Nauk* 5, 81(1974); *Chemical Abstracts* 83, 4833K (1975)
24. Joo, C.N., Cho, Y.D. and H.Y. Kwon: *Korean Biochem. J.*, 11(2), 81 (1978)