Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 7, No. 3, 157~164 (1979).

糸狀菌의 蛋白質分解酵素에 關한 硏究

(第1報) *Aspergillus awamori* U-3에 依한 Acid Protease의 生産 및 酵素의 特性

鄭 萬 在·*朴 南 圭

忠北大學校 農科大學 農化學科
*農工利用硏究所 農産物利用科

(1979년 6월 18일 수리)

Studies on the Proteolytic Enzyme of Mold

(Part 1) Production of Acid Protease by *Aspergillus awamori* U-3 and Characteristics of Enzyme

ManJae Chung and *Nam Kyoo Park

Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung-Buk National University
*Agricultural Products Utilization Division, Institute of Agricultural Engineering and Utilization

(Received June 18, 1979)

Abstract

These experiments were performed to investigate the culture condition, characteristic of crude enzyme and the heat resistance of the acid protease by *Aspergillus awamori* U-3.

The results obtained were as follows:

1. The optimum culture temperature and time on wheat bran medium and defatted rice bran medium were 30°C and 72 hrs, respectively.

The optimum amount of added water was 100~120 % on wheat bran medium and 100~130 % on defatted rice bran medium.

2. Of the these various ingredients, addition of KNO_3, glutamic acid and glucose on wheat bran medium and addition of KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$, glucose, lactose, KH_2PO_4 and $MgCl_2$ on defatted rice bran medium were very effective.

On wheat bran medium, concentration of addition of glucose, KNO_3 and glutamic acid were 3.0~4.0 %, 0.2~0.4 % and 1.0 %, respectively.

3. The optimum pH for the enzyme action was 2.4 %, the optimum temperature about 45°C and the stable pH range 2.0~5.0, The enzyme was stable below 50°C and was inactivated rapidly above 50°C.

4. The addition of $CaCl_2$ and $CaSO_4$ as the heat resistance agents showed the slight resistance.

5. When the enzyme solution added with the heat resistance agents ($CaCl_2$ and $CaSO_2$) was heated for 10-30 minutes at 60°C, their remaining activities were decreased largely above 20 minutes and The heat resistance effects of $CaCl_2$ and $CaSO_4$ were not observed almost at 80°C.

緒　論

微生物 protease는 作用하는 pH에 따라 酸性 protease, 中性 protease, alkali性 protease로 나누며 微生物의 種類에 따라 protease의 生産能이 서로 다르고 酵素的 特性도 多樣하며 또한 protease의 生産量은 培養條件에 따라 甚하게 달라진다.

酸性 protese에 關한 硏究로는 *Asp. oryzae*[1,2,3], *Asp. saitoi*[4,5,6], *Asp. usamii*[7], *Asp. niger*[7], *Asp. inuii*[7], *Rhiz. pepa*[8], *Rhiz. triiici*[9,10], *Rhiz. chinensis*[9,10,11], *Rhiz. japonicus* S-62[12], *Muc. recemosus*[9], *Muc. pussillus*[13], *Pen. thomii*[14], *Pen. oxalicum*[14], *Pen. purpurogenum*[15] 등의 酸性 protease를 들수가 있다.

筆者는 *Asp. awamori* U-3가 耐酸性이 强한 酸性 protease를 生産함을 밝혀내고 이 菌의 固體培養에 있어서의 酵素生産에 미치는 培地組成의 影響 및 粗酵素의 特性을 檢討하고 그 結果의 一部를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 供試菌株 : *Aspergillus awamori* U-3 (忠北大學校 農化學科 保管菌株)

2. 基本培地 및 培養方法

基本培地로는 wheat bran medium과 defatted rice bran medium을 使用하였다.

1) Wheat bran medium
   wheat bran: 5 g
   tap water: 5 m*l*
2) Defatted rice bran medium
   defatted rice bran: 5 g
   tap water : 5 m*l*

上記 培地를 잘 混合하여 三角 플라스크에 넣고 15 lbs에서 40分間 加壓殺菌後 供試菌을 1白金耳 접종하여 30°C에서 培養하였다. 但 培養時間에 關한 實驗 以外는 培養時間을 72 時間으로 하고, 添水量에 關한 實驗 以外는 wheat bran과 defatted rice bran에 對하여 添水量을 100%로 하였다.

3. 酵素液의 調製

各 培養플라스크에 100 m*l*의 蒸溜水를 添加하고 Homogenizer로 2分間 마쇄하여 酵素를 抽出하고 10,000 rpm으로 10分間 遠心分離한 後 上澄液을 酵素液으로 使用하였다.

4. 酵素活性의 測定

Milk casein을 基質로 하는 Anson-萩原變法[16,17]에 따라 酵素活性을 測定하였다.

1) 基質溶液

Hammarsten casein을 0.6%가 되게 McIlvaine buffer soln. (pH 2.7)에 용해시키고 5°C에서 保管하면서 使用하였다.

2) Protease activity의 測定

基質溶液 5 m*l*에 효소액 1 m*l*를 加하고 37°C에서 正確하게 10分間 反應시킨 후 0.44 M. TCA soln. 5 ml를 加하여 反應을 中止시키고 37°C에서 20分間 維持한 後 濾過하였다. 그 濾液 1 m*l*를 取하고 0.55 M Na_2CO_3 soln 10m*l*와 Folin reagent(3倍희석) 1 m*l*를 加하여 잘 混合한 後 37°C의 恒溫水槽에서 20分間 發色시켰다. 이 反應液에 대하여 660 mμ의 波長으로 吸光度를 測定하였다.

Blank는 酵素液에 0.44 M TCA soln을 加하여 酵素蛋白質을 沈澱시킨 後 上記와 같이 處理하고 吸光度를 測定하였다. 酵素力價는 Blank와의 差에서 吸光度의 增加量으로 表示하였다.

5. 酵素의 生産條件

培養時間에 따른 酵素活性의 變化를 調査하기 위하여 24時間 부터 120時間 까지 培養時間을 달리하여 培養하였으며, 培養時 添水量의 影響을 알기 爲하여 60%에서 140%까지 添水量을 달리하여 培養하였다. 또한 各種 成分을 添加하였을 때의 酵素生産에 미치는 影響을 보기 爲하여 無機窒素源(0.2%), 有機窒素源(1%), 炭素源(1%) 및 無機鹽類(0.2%)를 基本培地에 添加하여 培養하였다.

6. 酵素의 特性

本酵素의 酵素作用에 미치는 最適條件을 알기 爲하여 pH의 影響, 溫度의 影響, 熱安定性, pH 安定性 및 酵素의 耐熱性 實驗을 實施하였다.

實驗結果 및 考察

1. 酵素의 生産條件

1) 培養時間의 影響

基本培地를 使用하여 培養時間別로 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 1과 같으며 30°C에서 72時間 培養時에 最高의 活性을 나타내었다. 鄭등[18]은 wheat bran medium과 rice bran medium에서 *Myriococcum sp.*의 培養時間은 다 같이 144 時間이라고 하였으며, Ichishima 등[19]은 30°C에서 62~64 時間 培養時 *Asp. saito*의 protease生産을 增加시키는데 가장 適當하다고 하였고, 鄭[12]은 *Rhiz japonicus* S-62의 밀기울 培地에서의 最適培養時

間은 48時間이며, 梁[20]은 *Asp. sojae*는 50時間, *Asp. flavus*는 60時間 培養時에 가장 높은 活性을 나타내었다고 하였으며, 坂本[8]는 *Asp. inuii*, *Asp. usamii*, *Asp. orgzae* 등의 培養時間은 30~40時間이라고 報告하였다. 이와같이 菌株에 따라서 最適培養時間에 相異한 차이가 있음을 보여주고 있다.

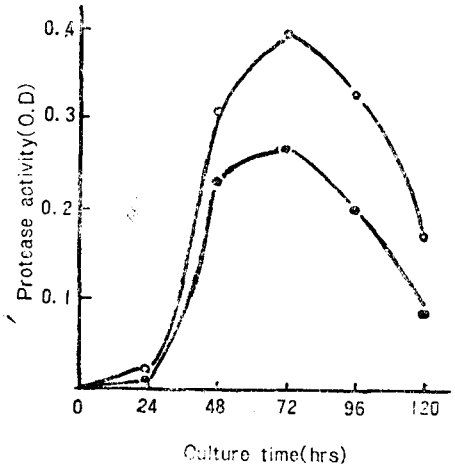

Fig. 1. Effect of Culture Time on the Protease Production
—○— Wheat bran medium
—●— Defatted rice bran medium

2) 培地添水量의 影響

여러가지 比率로 물을 基本培地에 添加하여 30°C에서 72時間 培養한 結果는 Fig. 2와 같이 wheat bran medium에서 100~120 %, defatted rice bran medium에서는 100~130 %가 最適이었다.

培地 添水量에 關한 硏究를 보면 Ichishima 등[19]은 *Asp·saitoi*는 50~70 %에서 protease의 生産에 效果的이라고 하였으며, 鄭[12]은 *Rhiz japonicus* S-62에 있어서 밀기울培地의 最適 添水量은 100~120 %, 許[21]는 *Rhiz. oryzae*의 培養時에는 80~120%의 添水量이 效果的이라고 報告하였는데 本菌株는 이들 *Rhizopus*屬의 結果와 거의 一致하고 있다.

3) 炭素源 添加試驗

基本培地에 各各 各種 炭素源을 1 %씩 添加하고 72時間, 30°C에서 培養한 結果는 Table 1과 같으며 wheat bran medium에서는 glucose가 效果的이었으며 defatted rice bran medium에서는 glucose

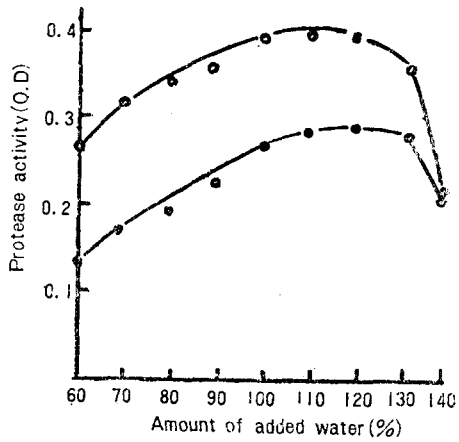

Fig. 2. Effectof the Amount of Added Water on the Protease Production
—○— Wheat bran medium
—●— Defatted rice bran medium

와 lactose가 效果的이었다. wheat bran medium에서 가장 效果的인 glucose를 濃度를 달리하여 添加하고 試驗한 結果는 Table 2와 같이 添加濃度는 3.0~4.0 %이었다.

Ichishima 등[19]은 *Asp. saitoi*의 protease生産에 炭素源을 添加했을때 큰 效果를 나타내지 않았다고 하였으며, 鄭[12]은 *Rhiz. japonicus* S-62의 protease生産에 fructose[21] sucrose의 添加가, 許 와는 *Rhiz·oryzae*의 경우 glucose의 添加가 效果的이었다고 하였다. 이와같이 炭素源의 添加影響이 다른것은 菌株 및 培地의 差異에 基因되는 것으로 生覺된다.

Table 1. Effect of Carbon Sources on the Protease Production.

Carbon sources	Protease activity (O. D.)	
	Wheat bran medium	Defatted rice-bran medium
Sucrose	0. 312	0. 241
Starch	0. 284	0. 255
Glucose	0. 425	0. 339
Lactose	0. 358	0. 352
Myoinositol	0. 321	0. 267
Maltose	0. 312	0. 176
Galactose	0. 256	0. 237
Control	0. 390	0. 261

Table 2. Effect of Concentration of Glucose on the Protease Production (on wheat bran medium).

Concentration of glucose (%)	Protease activity (O. D)
0	0. 390
1. 0	0. 425
2. 0	0. 428
3. 0	0. 450
4. 0	0. 446

4) 無機窒素源의 添加試驗

基本培地에 各各 各種 窒素源을 0.2 %씩 添加하여 30°C 에서 72 時間 培養한 結果는 Table 3 과 같으며 wheat branmedium 에서 KNO_3와 $(NH_4)_2HPO_4$가, defatted rice bran medium 에서는 KNO_3와 $(NH_4)_2SO_4$가 效果的이었다. wheat bran medium 에서 가장 優秀한 KNO_3를 濃度別로 添加하여 試驗한 結果는 Table 4 와 같이 最適 添加濃度는 0.2 ~0.4 %이었다.

無機窒素源의 添加驗試에 關한 硏究를 보면 Ichishima 등[19]은 *Asp. saitoi*, *Asp. usamii* 가 NH_4Cl의 添加로, *Asp. saitoi*, *Asp. aureus* 는 $NaNo_3$의 添加로 酸性 protease의 生産을 增加시켰다고 하였는데 本菌株에 있어서는 基本培地에 KNO_3의 添加가 特히 效果的이었는데 이는 鄭[12]의 結果와 大略 一致하고 있다.

Table 3. Effect of Inorganic Nitrogen Sources on the Protease Production.

Inorganic nitrogen sources	Protease activity (O. D)	
	Wheat bran medium	Defatted rice bran medium
$(NH_4)_2SO_4$	0. 300	0. 340
NH_4Cl	0. 255	0. 285
$NaNO_3$	0. 240	0. 290
$(NH_4)_2HPO_4$	0. 405	0. 195
NH_4NO_3	0. 298	0. 245
KNO_3	0. 435	0. 315
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0. 380	0. 210
Control	0. 390	0. 261

Table 4. Effect of Concentration of KNO_3 on the Protease Production (on wheat bran).

Concentration of KNO_3 (%)	Protease activity (O. D)
0	0. 390
0. 1	0. 398
0. 2	0. 435
0. 3	0. 438
0. 4	0. 434

5) 有機窒素源의 添加試驗

各種 有機窒素源을 各各 1%씩 wheat bran medium 과 defatted rice bran medium 에 添加하여 72 時間 培養한 結果는 Table 5 와 같이 wheat bran medium 에서는 glutamic acid 와 albumin 이 效果的이었으며, defatted rice bran medium 에서는 添加效果를 나타내지 않았다. Wheat bran medium 에서 效果的인 glutamic acid 를 濃度別로 添加하였을때 最適添加濃度는 1%이었다. 許[21]는 *Rhiz oryzae* 가 albumin 과 casein 의 添加로, Ichishima 등[19]은 NH_4-citrate 와 NH_4-tartrate 의 添加로 *Asp. saitoi* 의 protease 生産을 增加시켰다고 하였고, 鹽田[22]는 米麴 製造時 sodium glutamate 의 添加는 alkaline protease 의 生産을 크게 增加시켰다고 하였는데 本菌株에서도 protease 生産을 相當히 增加시켰다.

Table 5. Effect of Organic Nitrogen Sources on the Protease Production.

Organic nitrogen sources	Protease activity (O. D)	
	Wheat bran medium	Defatted rice bran medium
Defatted soybean	0. 350	0. 205
Glutamic acid	0. 450	0. 183
Polypeptone	0. 105	0. 095
Casein	0. 130	0. 183
Urea	0. 135	0. 069
Albumin	0. 410	0. 196
Yeast	0. 340	0. 261
Soybean meal	0. 315	0. 255
Control	0. 390	0. 261

Table 6. Effect of Concentration of Glutamic acid on the Protease Production (on wheat bran medium).

Concentraton of glutamic acid (%)	Protease activity (O. D)
0	0. 390
1. 0	0. 445
2. 0	0. 381
3. 0	0. 326
4. 0	0. 314

6) 無機鹽類의 添加試驗

各種 無機鹽類를 基本培地에 各各 0.2 %씩 添加하고 30°C 에서 72時間 培養한 結果는 Table 7 과 같으며 wheat bran medium 에서는 效果를 보지 못하였으나 defatted rice bran medium 에서는 KH_2PO_4, $Mgcl_2$, $MgSO_4$ 및 $CaCl_2$ 의 添加는 效果的이었다. 無機鹽類에 關한 硏究로서 元永[23]은 KH_2PO_4 의 添加는 *Asp. oryzae* 의 protease 의 生産에, *Rhiz. japponicns* S-62[12]에 있어서 Na_2HPO_4 와 NaH_2PO_4 의 添加는 protease 生産에 效果的이었으며, Ichishima 등[19]은 NaH_2PO_4 의 添加로 *Asp. saitoi* 의 酸性 protease 의 生産에 약간의 效果를 보았다고 하였다. 이와같이 無機鹽類의 添加效果가 다른것은 菌株 및 培地組成의 差異에 基因되는 것으로 思料된다.

Table 7. Effect of Inorganic Salt on the Production.

Inorganic salt	Protease activity (O. D)	
	Wheat bran medium	Defatted rice bran medium
$CaCl_2$	0. 370	0. 300
K_2HPO_4	0. 270	0. 290
KH_2PO_4	0. 283	0. 350
Na_2HPO_4	0. 295	0. 235
NaH_2PO_4	0. 273	0. 285
$MgSO_4$	0. 309	0. 319
$MgCl_2$	0. 270	0. 325
Control	0. 390	0. 261

2. 粗酵素의 特性

1) pH 의 影響

Mcllvaine buffer soln 을 使用하여 基質溶液의 pH 를 所定 pH 로 調節한 다음 protease 의 活性을 測定한 結果는 Fig. 3과 같이 最適 pH 는 2.4로 本酵素는 酸性 protease 에 屬한다.

松島[9]는 *Rhiz. peka, Rhz. chinensis, Rhiz. japanicus, Rhiz. tritici, Aspiniger* 型의 protease 는 pH 3.0 에서 높은 活性을 갖는다고 하였고, 友田[24]는 *Trametes sanguinea* 의 protease 의 opt. pH 는 2.5, 小疇[25]는 *Asp. niger var. macroporus* protease 의 opt. pH 가 2.5~3.0, 村尾등[26]은 *Rhodo. glutinius* No. K-24 protease 의 opt. PH 는 2.8, 吉村[15,27]는 *Pen. rubrum, Pen. purpurogenum* 의 酸性 protease 는 最適 pH 가 3.5라고 하였는데 本菌株가 生産하는 protease 는 acid Protease 로서 다른 絲狀菌의 酸性 protease 와 비슷한 opt. pH 를

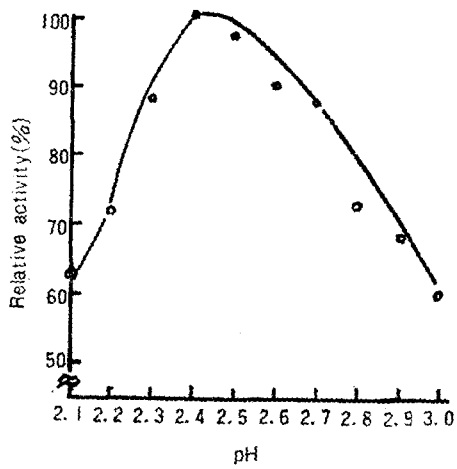

Fig. 3. Effect of pH on the Protease Activity.

나타내고 있다.

2) 熱安定性

酵素液 1 ml 에 Mcllvaine buffer soln. (pH 2.4) 1 ml 를 加하고 所定溫度에서 10 分間 維持시킨 後 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 4 와 같이 50°C 以下에서는 安定性을 보여주고 있으나, 그 以上에서는 不安定하여 60°C 에서는 約 55 %, 70°C 에서는 約 80 %가 失活되었다. 熱安定性에 關한 硏究를 보면 吉村[4]는 *Pen. purpurogenum* protease 는 pH 3.0에서 60°C, 10分 處理로 殘存活性은 約 40 %이었고 Yoshida[4]는 *Asp. saitoi* protease 의 熱安定

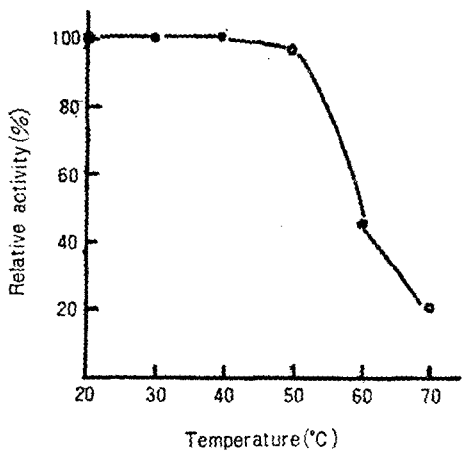

Fig. 4. Effect of Temperature on the Protease Stability.

性은 50°C 까지 이고, 55°C 에서 10分 處理로 失活된다고 하였고, 布川등[3]은 *Asp. oryzae* 의 acid protease 와 alkaline protease 는 60°C 에서 10分間 處理로 殘存活性은 全然 없었다고 하였으며, *Rhiz. chinensis* protease[11]는 60°C 以下溫度에서 15分間 處理로는 安定하나, 65°C 에서는 20 %가 失活되었다고 하였다. 本菌株가 生産하는 protease 는 比較的 耐熱性이 弱한 便에 屬하나 *Asp. oryzae* 의 acid protease 와 alkaline proteas 보다는 耐熱性이 훨씬 큼을 보여주고 있다.

3) 溫度의 影響

20~60°C 에서 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 5 와 같으며 本酵素의 最適反應度는 45°C 內外이었다. *Rhiz. chinensis* protease[18]의 opt. temp. 는 60°C 內外, *Asp. oryzae* protease[1] Ⅰ, Ⅱ는 50°C, Ⅲ는 45°C, *Pen. purpurogenum* Protease[4]는 55°C, *Rhiz japonicus* S-62 protease[12]는 40°C, *Myriococcum sp.* 의 protease[18]는 55°C 라고 하였는데 本菌株의 protease 는 45°C 內外로서 一般的으로 이들 菌株의 protease 보다 낮은 溫度를 適溫으로 하고 있다.

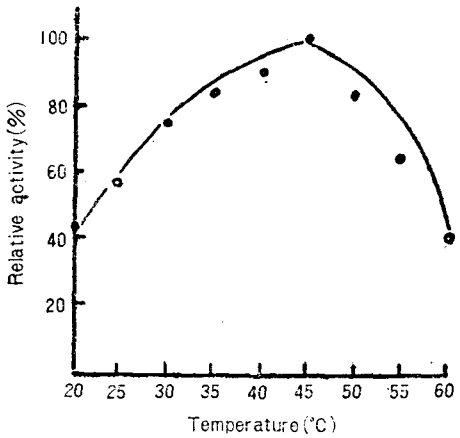

Fig. 5. Effect of Temperature on the Protease Activity.

4) pH 安定性

pH 의 安定性을 調査하기 爲하여 酵素液 1 m*l* 에 McIlvane buffer soln. 1 m*l* 을 加하여 5°C 에서 24時間 放置한 後 pH 가 2.4 가 되도록 調節하고 酵素의 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 6 과 같이 pH 2.0~5.0 사이에서 安定性을 나타내었으며 pH 6.0 以上에서는 急激하게 不活性化되었다. 安定 pH 의

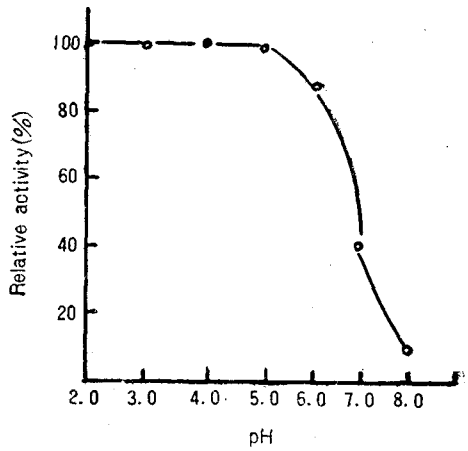

Fig. 6. Effect of pH on the Protease Stability.

硏究를 보면 *Paecillomyces varioi* protease[28]의 pH 安定範圍는 2.0~6.0 *Mucor pussillus* 의 凝乳酵素[13]는 *Rhiz. chinensis* protease[11]는 2.8~6.5, *Pen. purpurogenum* protease[4]는 2.5~6.0, *Asp. saitoi* protease[4,5]는 2.5~6.0, *Rhiz. japonicus* S-62 protease[12]는 2.5~5.0이라고 하였는데 本菌株의 酸性 protease 도 이들 酸性 protease 와 같이 酸性에서 安定하였다.

5) 耐熱性試驗

(1) 各種 鹽類의 添加影響

酵素液 1 m*l* 에 蒸溜水 1m*l* 를 加하고 各種 耐熱

Table 8. Effect of Various Salt on the Heat Resistance of Protease.

Various salt	Remaining protease activity (%)
NaCl	24.11
Na_2SO_4	7.95
KNO_3	5.90
$NaNO_3$	17.70
Na_2CO_3	5.90
CH^{8}Cook	10.52
KH_2PO_4	21.80
NaH_2PO_4	16.93
$CaCl_2$	43.59
$CaSO_4$	39.75
KCl	11.54
K_2SO_4	19.49
Non addition	15.39

劑를 10 mg씩 添加하여 60°C에서 10分間 處理한 後 殘存活性을 測定한 結果는 Table 8과 같이 耐熱劑中 $CaCl_2$와 $CaSO_4$가 各各 43.59 %, 39.75 %의 殘存活性을 나타내었다.

松島[29]는 麴菌 protease에 $CaCl_2$, NaCl, glycine, agar-ager 등을 0.1 %, 0.5 %, 1.0 %씩 添加하여 50°C, 55°C, 60°C로 15分間 加熱處理하여 殘存活性을 測定한 結果 NaCl, glycerine은 効果가 없으나 $CaCl_2$와 agar-agar는 保護作用을 나타내었다고 하였으며 鄭[30]은 *Rhiz. japonicus* S-62 protease의 耐熱性試驗에서 NaH_2PO_4와 KH_2PO_4가 耐熱効果가 가장 좋았다고 하였는데 本菌株의 protease에 對하여는 NaH_2PO_4와 KH_2PO_4의 耐熱効果는 全然 認定할수 없었다.

(2) 加熱時間의 影響

酵素液 1m*l*에 蒸溜水 1 m*l*를 加하고 各各 $CaCl_2$와 $CaSO_4$를 10 mg씩 添加하여 60°C에서 10~30分間 加熱處理한 後 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 7과 같으며 $CaCl_2$와 $CaSO_4$는 다같이 20分 以上에서는 殘存活性이 크게 減少되었다.

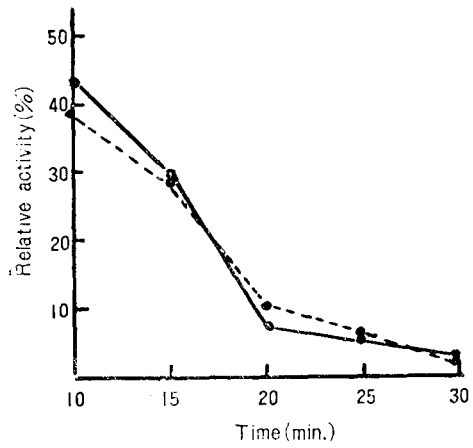

Fig. 7. Effect of Heating Time on the Heat Resistance of Protease.
—○— $CaCl_2$
···●··· $CaSO_4$

(3) 加熱溫度의 影響

酵素液 1 m*l*에 蒸溜水 1 m*l*를 加하고 $CaCl_2$와 $CaSO_4$를 10 mg씩 添加하고 60~80°C에서 10分間加熱處理하였을때의 結果는 Fig. 8과 같이 溫度가 높아짐에 따라 耐熱効果가 크게 減少되어 80°C

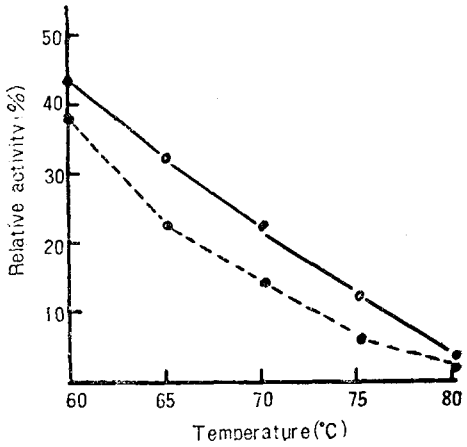

Fig. 8. Effect of Temperature on Heat Resistance of Protease
—○— $CaCl_2$
···●··· $CaSo_4$

에서는 殘存活性이 거의 나타나지 않았다.

要 約

Aspergillus 屬菌中 *Asp. awamori* U-3가 acid protease의 生産能이 優秀함으로 酵素生産에 미치는 培養條件 및 粗酵素의 特性을 檢討하고 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 最適培養溫度는 30°C, 最適培養時間은 72時間, 最適添水量은 wheat bran medium에서는 100~120 %, defatted rice bran medium에서는 100~130%이었다.

2. 各種 成分中 wheat bran mediun에는 KNO_3, glutamic acid, glucose가, defatted rice bran medium에는 KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$, glucose, lactose, KH_2PO_4 및 $MgCl_2$의 添加가 特히 効果的이었으며, wheat bran medium에서 가장 効果的인 glucose, KNO_3와 glutamic acid의 最適 添加濃度는 各各 3.0~4.0%, 0.2~0.4%, 1.0 %이었다.

3. 本酵素의 作用 最適 pH는 2.4, 最適溫度는 45°C 內外, 安定 pH 範圍는 2.0~5.0이고, 50°C 以下에서는 安定하나 그 以上에서는 急激하게 不活性化 되었다.

4. 本酵素에 對한 各種 無機鹽類의 耐熱効果를 檢討한바 $CaCl_2$와 $CaSO_4$가 약간의 耐熱効果를 나타내었다.

5. 耐熱劑를 添加하고 60°C 에서 10~30 分間 處理할때 20分 以上에서는 酵素의 殘存活性이 크게 減少되었고, 耐熱劑로서 $CaCl_2$와 $CaSO_4$를 添加할 때 다같이 80°C 에서는 耐熱效果는 거의 없었다.

參考文獻

1. 蔭山公雄：醱工誌, **33**, 53(1955)
2. 松島欽一：醱工誌, **36**, 414(1959)
3. 布川彌太郎, 難波康之祐, 廣山陽三：日農化, **36**, 879(1962)
4. 吉村貞彥：日農化, **26**, 179(1955)
5. Yoshida, F.: *Bull, Agr, Chem, Soc.* Japan, **20**, 252(1956)
6. 吉田文彥, 一島英治：生化學, **35**, 534(1963)
7. Ichishima, E. and Yoshida, F.: *Agr. Biol. Chem.* Japan **27**, 302(1963)
8. 坂本政義：西發工誌, **35**, 228, 278(1957)
9. 松島欽一：日農化, **32**, 215(1958)
10. 松島欽一： 〃 **33**, 116(1959)
11. Fukmoto, J., D. and Yamamoto, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 710(1997)
12. 鄭萬在：韓國食品科學會誌, 9, 31(1977)
13. 有馬啓, 岩崎愼二郎：日農大會要旨 p. 57(1962)
14. 坂本正義：日農化, **35**, 386, 431(1957)
15. 團野源一, 吉村貞彥：日農化大會要旨 p. 11 (1963)
16. Anson, M. L.: *J. Gen, Physiol.*, **22**, 79(1938)
17. Hakihara, B., Matsubara, H., Nakai, H. and Okunki, K.: *J. Biol. Chem.*, **45**, 185(1958)
18. 鄭東孝, 李啓瑚：韓國農化, **13**, 223(1970)
19. Ichishima, E. and Yoshida, F.: *Agr, Biol. Chen.*, **26**, 547(1962)
20. 梁漢喆：韓國農化, **7**, 67(1966)
21. 許之寧：*Thesis collection of the graduate school*(Chung-Buk University) **3**, 71(1977)
22. 鹽田日出夫：韓國食品科學會誌,
23. 之永和生, 三浦勇吉：日農化, **32**, 422(1958)
24. 友田勝已：酵素化學シンポジウム豫講集, **14**, 1(1962)
25) 小疇吉久他：日農化大會要 p. 14(1963)
26. 旨村尾潮·夫鎌田誠啓：日農化, **46**, 167(1972)
27. 吉村貞彥, 岩田患昭, 團野源一：日農化, **38**, 128(1964)
28. 山甲哲夫, 安井一, 澤田二郎, 田中一郎：日農化, **35**, 1264(1961)
29. 松島欽一：日農化, **29**, 87(1955)
30. 鄭萬在：*Korean, J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **5**, 153(1977)