

Aspergillus oryzae KC-15에 의한 protease의 生産 및 그 酵素의 特性에 관한 研究

*李美子, 鄭萬在

*忠北大學校 大學院 農化學科 · 忠北大學校 農科大學 農化學科
(1980년 2월 20일 수리)

Studies on the Production of Protease by *Aspergillus Oryzae* KC-15 and Characteristics of the Enzymes

*Mi Ja Lee, Man Jae Chung

*Department, of Agricultural Chemistry, Graduate School, Chung-Buk National University
Department, of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung-Buk National University
(Received February 20, 1980)

Abstract

This experiment was conducted to investigate the conditions for production and the characteristics of proteases. *Aspergillus oryzae* KC-15, which is selected as a superior strain for the production of the protease, was used in this study. The results obtained were as follows:

1. The optimum culture time for the production of acid, neutral and alkaline protease on wheat bran medium were about 48, 48 and 72hr, respectively. The protease-produced by the strain were mainly alkaline and neutral one, but the production of acid protease was feeble extremely.
2. The addition of NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , glucose, rice powder and Na-glutamate respectively to wheat bran media were effective for the production of alkaline and neutral protease, and the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, glucose and rice powder respectively were effective for the production of acid protease.
3. Characteristics of proteases

Characteristics	Acid protease	Neutral protease	Alkaline protease
Opt. pH	3.4	7.2	9.0
Opt. temp(°C)	45	40	40
pH stability	3~7	6~8	6~11
Thermal Stability	nearly inactivated for 15min. at 70°C	nearly inactivated for 10min. at 60°C	nearly inactivated for 5min. at 60°C

4. As a heat resistance agent, NaH_2PO_4 was the most effective one. The optimum amount of NaH_2PO_4 was 10mg for alkaline and neutral protease, and 5mg for acid protease.
5. The heat resistance of the protease by NaH_2PO_4 was not recognized mostly above 60°C.
6. After the treatment of enzyme solution with 10mg of NaH_2PO_4 for 30 minutes at 55°C, the residual activities measured for alkaline, neutral and acid protease were 58, 57 and 55% respectively.

緒 論

微生物이 生産하는 protease 는 作用하는 pH 에 따라 acid protease, neutral protease 및 alkaline protease 로 三大別하며 같은 菌株에 있어서도 培養條件 및 培地組成에 따라 그 比率 및 生産량이 현저하게 달라진다. 微生物 protease 는 食品加工과 밀접한 관계를 가지고 있는 酵素로써 그 용도가 다양하다. 麴菌의 protease 에 관한 研究로는 *Asp. niger*⁽¹⁻³⁾, *Asp. oryzae*⁽³⁻¹⁸⁾ *Asp. saitoi*^(1,16), *Asp. inuii*^(1,3), *Asp. aureus*^(1,15), *Asp. nakazawai*^(1,15), *Asp. flavus*⁽¹⁹⁾, *Asp. sojae*^(15,20), *Asp. sydowi*⁽²¹⁾, *Asp. melleus*⁽²²⁾ 등을 들 수 있다. Protease 의 生産에 관하여는 菌株의 選定 및 生産技術面에서 解決하여야 할 問題가 많은 것으로 생각된다.

本 實驗에서는 wheat bran medium 에서 protease 를 多量 生産하는 *Aspergillus* 屬 菌株를 얻고져 自然界에서 分離한 30菌株(메주: 12菌株, 土壤: 6菌株, 麴子: 9菌株, 空氣: 3菌株)와 保管中인 *Aspergillus* 屬 21菌株에 대한 protease 의 生産能을 調査한 結果 筆者가 1975年 土壤에서 分離, 同定하여 保管中인 *Aspergillus oryzae* KC-15가 特히 alkaline protease 와 neutral protease 의 生産能이 優秀하였으므로 이 菌株의 酵素生産에 미치는 培地組成의 影響 및 粗酵素의 特性을 檢討하고 몇가지 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 菌 株

Asp. oryzae KC-15(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 medium 을 使用하였다. Wheat bran 5g 과 tap water 5ml 를 삼각후라스크에 넣고 잘 혼합하여 15lb 에서 40분간 加壓殺菌한 후 供試菌을 1白金耳씩 接種하여 30°C 에서 培養하였다. 但 培養時間에 관한 實驗 이외에는 培養時間을 48시간으로 하였다.

3. 酵素液의 調製

자 배양후라스크에 100ml 의 蒸溜水를 添加하고 Homogenizer 로 2분간 攪拌하여 酵素를 抽出하고 10,000 r. p. m (Sorrval, ss-1)으로 10분간 遠心分

離한 후 上澄液을 酵素液으로 使用하였다.

4. 酵素活性的 測定

Milk casein 을 基質로 하는 Anson-萩原變法⁽²³⁻²⁶⁾에 依하여 測定하였다.

1) 基 質

Hammarsten milk casein 을 0.6%가 되게 소정 pH 의 완충액에 溶解시켜 使用하였다.

Acid protease 와 neutral protease 의 activity 測定은 각각 pH 3.0과 pH 7.0의 McIlvaine buffer 용액을, alkaline protease 는 pH 9.0의 Atkins & pantin buffer 용액을 使用하였다.

2) 測定方法

소정 pH 의 0.6% casein 용액 5ml 에 酵素液 1ml 를 넣고 38°C 에서 正確하게 10분간 反應시킨 후 0.44M TCA 용액 5ml 를 가하여 反應을 停止시키고 38°C 에서 20분간 維持한 후 濾過하였다. 濾液 1ml 를 試驗管에 取하여 0.55M Na₂CO₃ 용액 10ml 와 Folin reagent(3 배 희석액) 1ml 를 넣고 잘 혼합한 후 38°C 의 water bath 에서 20분간 發色시켜 660m μ 의 波長으로 吸光度를 測定하였다. Blank 는 酵素液 1ml 에 0.44M TCA 용액을 가하여 酵素蛋白質을 沈澱시킨 후 上記와 같이 處理하여 測定하였다. 酵素力價는 Blank 와의 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 酵素活性的 變化를 조사하기 위하여 24시간부터 120시간까지 培養時間을 달리 하여 培養하였다. 또한 酵素生産에 미치는 各種成分의 影響을 調査하기 위하여 窒素源(窒素로서 0.1%), 炭素源(1%) 및 磷酸鹽(0.2%)을 基本培地에 각각 添加하여 培養하였다.

6. 粗酵素의 特性

本 酵素의 最適 pH, 最適溫度, 安定性, 熱安定性 및 耐熱性を 조사하였다.

結果 및 考察

1. 酵素의 生産條件

1) 培養時間

基本培地를 使用하여 培養時間別로 酵素活性的을 測定한 結果는 Fig. 1 과 같이 acid protease 와 neutral protease 는 30°C 에서 48시간 배양시에, al-

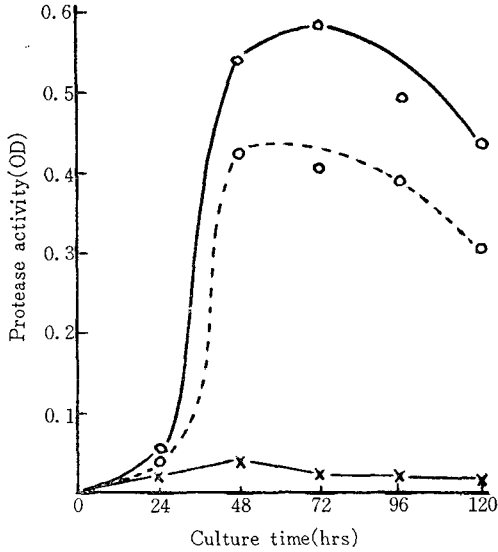


Fig. 1. Effect of culture time on the protease production

- ×—× acid protease
- neutral protease
- alkaline protease

alkaline protease는 72시간 培養時에 最高의 活性을 나타내었으며, 本 菌株가 生産하는 protease는 alkaline protease와 neutral protease가 主體이고 acid protease는 극히 微弱하게 生産되었다.

Wheat bran medium에서의 最適培養時間은 *Asp. sojae*⁽¹⁹⁾는 50시간, *Asp. flavus*⁽²¹⁾는 60시간이 있고, 坂本등⁽³⁾은 *Asp. niger*, *Asp. oryzae* SH 2-7, *Asp. oryzae* S 4-18, *Asp. awamori* 등의 最適培養時間은 30~40시간이라고 報告하였다. 이와같이 菌株에 따라 培養時間에 약간의 差異를 보여주고 있다.

2) Rice powder의 代替試驗

基本培地の 一部를 rice powder로 代替하여 培養한 結果는 Fig. 2와 같이 alkaline protease와 neutral protease는 다 같이 wheat bran 4g와 rice powder 1g의 混合培地에서 生産이 增加되었으므로 그 이상의 代替에서는 完滿하게 減少되었다. 그러나 acid protease는 rice powder의 代替量이 2.5g까지 계속 完滿하게 增加되었다.

坂本등⁽³⁾은 米麴 protease의 主體는 acid protease고 麴麴 protease 주체는 alkaline protease라고 하였으며, 松島⁽²⁾도 米麴 protease의 主體는 acid protease이며 alkaline protease는 극히 微弱하다고 하였다. 本實驗에서 rice powder의 代替量이 많을

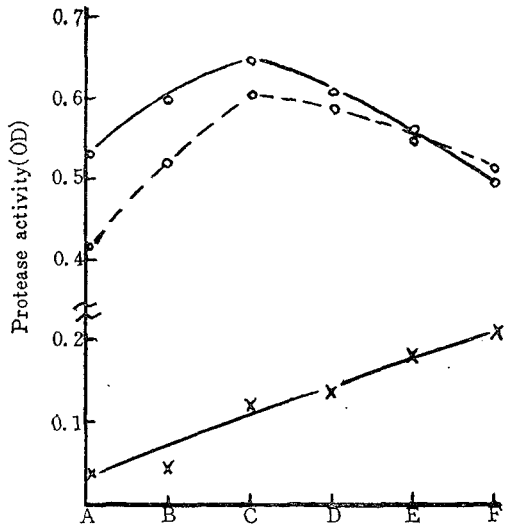


Fig. 2. Effect of combined materials on the protease production

- A: wheat bran 5 g
- B: " 4.5g+Rice powder 0.5g
- C: " 4.0g+ " 1.0g
- D: " 3.5g+ " 1.5g
- E: " 3.0g+ " 2.0g
- F: " 2.5g+ " 2.5g

수록 acid protease의 activity가 增加하는 反面에 alkaline 및 neutral protease의 activity가 漸次 減少되는 傾向을 보인 것은 培地의 C/N比가 클수록 acid protease의 生産이 많아진다는 好井등⁽¹⁸⁾의 結果와 一致하고 있다.

3) 炭素源의 添加試驗

各種 炭素源을 基本培地에 각각 1%씩 添加하여 培養한 結果는 Table 1과 같이 一般적으로 glucose의 添加는 効果的이었다. 가장 效果가 큰 glucose의 添加 濃度를 달리하여 培養한 結果는

Table 1. Effect of carbohydrates on the protease production

Carbon sources	Protease activity (O. D)		
	Acid protease	Neutral protease	Alkaline protease
Sucrose	0.111	0.321	0.361
Starch	0.054	0.396	0.496
Glucose	0.066	0.470	0.625
Lactose	0.068	0.352	0.500
Maltose	0.010	0.310	0.450
Control	0.046	0.416	0.540

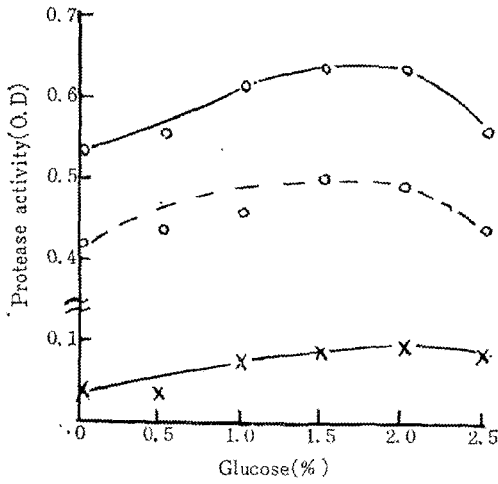


Fig. 3. Effect of glucose on the protease production

Fig. 3과 같이 3種의 protease 에 대한 最適添加量은 1.5~2.0%이었다.

Ichishima 등⁽¹⁾은 *Asp. saitoi* R 3813 mut. UV-13의 acid protease 生産에 있어 wheat bran 에 soluble starch, sucrose, glucose 의 添加는 別效果가 없었으나 lactose 를 1% 添加하였을 때 약간의 效果를 보았으며 朴⁽²⁷⁾은 *Asp. awamori* U-3의 acid protease 生産에, 許⁽²⁸⁾는 *Rhiz. oryzae* 의 acid protease 生産에 glucose 의 添加는 效果의이었다고 報告하였다. 이와같이 炭素源의 添加影響이 다른 것은 菌株의 差異에 基因되는 것으로 사료된다.

Table. 2. Effect of nitrogen compounds on the protease production

nitrogen sources	Protease activity (O. D)		
	acid protease	neutral protease	alkaline protease
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.071	0.449	0.395
NaNO ₃	0.060	0.424	0.516
NH ₄ NO ₃	0.036	0.398	0.505
NH ₄ Cl	0.010	0.017	0.319
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.084	0.472	0.550
Casein	0.013	0.430	0.546
Albumin	0.070	0.370	0.514
Peptone	0.007	0.417	0.561
Yeast	0.030	0.426	0.534
Na-glutamate	0.032	0.565	0.650
Control	0.046	0.416	0.540

4) 窒素源의 添加試驗

각종 窒素源을 基本培地에 窒素로써 0.1%씩 添加하여 培養한 結果는 Table 2와 같다.

Acid protease 의 生産에는 (NH₄)₂HPO₄가, neutral protease 와 alkaline protease 의 生産에는 Na-glutamate 가 가장 效果的이었다. Na-glutamate 와

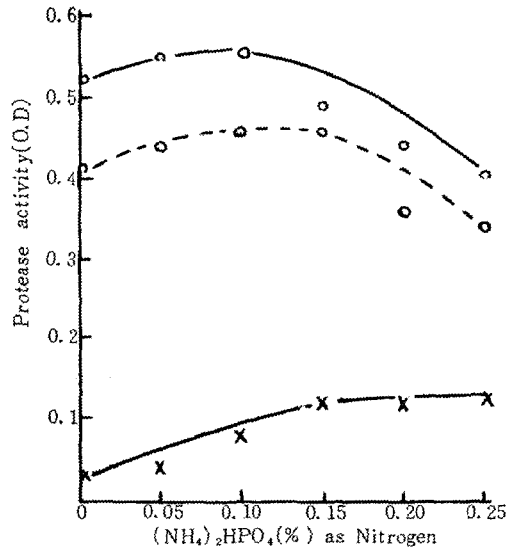


Fig. 4. Effect of (NH₄)₂HPO₄ on the protease production

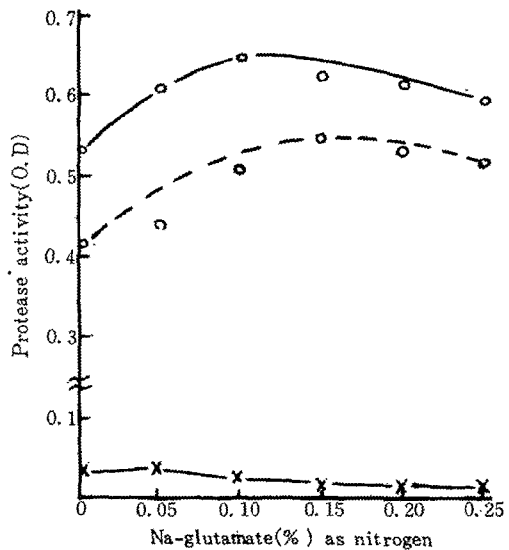


Fig. 5. Effect of Na-glutamate on the protease production.

(NH₄)₂HPO₄를 濃度別로 添加하여 試驗한 結果는 Fig. 4, 5와 같다.

Wheat bran 에 (NH₄)₂HPO₄를 질소원으로 0.1% 를 添加하였을 때 neutral protease 와 alkaline protease 의 生産에는 별 影響이 없었으며 그 이상의 濃度에서는 緩慢한 減少現像을 나타내었고 acid protease 의 生産은 0.15% 添加時까지 增加하였으나 그 이상의 濃度에서는 별로 變化가 없었다. 한편 Na-glutamate 의 添加는 neutral protease 와 alkaline protease 의 生産을 크게 增加시켰으나, acid protease 의 生産은 添加量이 많아짐에 따라 減少되었다. (NH₄)₂HPO₄의 添加效果에 대한 研究報文은 거의 찾아볼 수 없으며 다만 *Asp. saitoi*의 acid protease⁽¹⁾生産에 效果가 있었다는 報告가 있을 뿐이다. 鹽田⁽²⁹⁾는 *Asp. sojae*를 利用한 米麴製造時 Na-glutamate 를 질소로써 0.1~0.2% 添加하였을 때 alkaline protease 의 生産은 增加되었으나 acid protease 는 減少되었다고 報告하였는데 本菌株의 경우도 이 結果와 대략 一致하고 있다.

5) 磷酸鹽의 添加試驗

각종 磷酸鹽을 基本培地에 각각 0.2%씩 添加하여 培養한 結果는 Table 3 과 같다.

Table 3. Effect of phosphate salts on the protease production

Phosphate salts	Protease activity (O. D)		
	Acid protease	Neutral protease	Alkaline protease
Na ₃ PO ₄	0.039	0.303	0.622
Na ₂ HPO ₄	0.050	0.472	0.712
NaH ₂ PO ₄	0.086	0.576	0.716
KH ₂ PO ₄	0.078	0.440	0.611
Control	0.046	0.416	0.540

效果가 큰 Na₂HPO₄와 NaH₂PO₄를 濃度別로 添加하여 酸素生産에 미치는 影響의 結果는 Fig. 6 및 7과 같다.

NaH₂PO₄의 最適添加量은 alkaline protease 와 neutral protease 는 다 같이 0.3%이었고 acid protease 에 대하여는 0.4%이었다. Na₂HPO₄의 最適添加量은 alkaline protease 에 대하여는 0.2%, neutral protease 에 대하여는 0.3%이었다. NaH₂PO₄ 와 Na₂HPO₄에 대한 연구는 거의 없으며 다만 Ichishima 등⁽¹⁾은 *Asp. saitoi*의 acid protease 생산에 0.5%의 NaH₂PO₄의 添加는 약간의 效果를 나타내

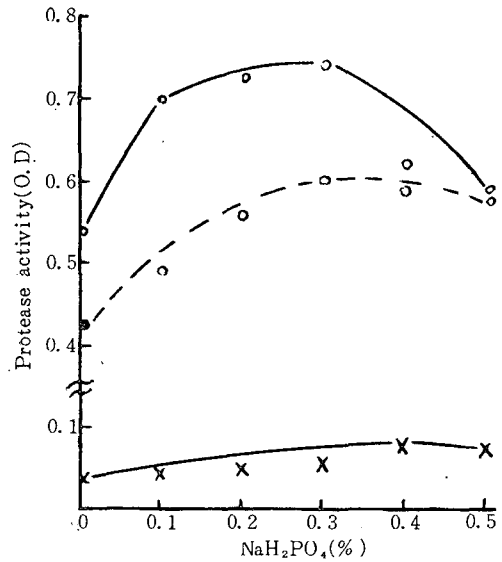


Fig. 6. Effect of NaH₂PO₄ on the protease production.

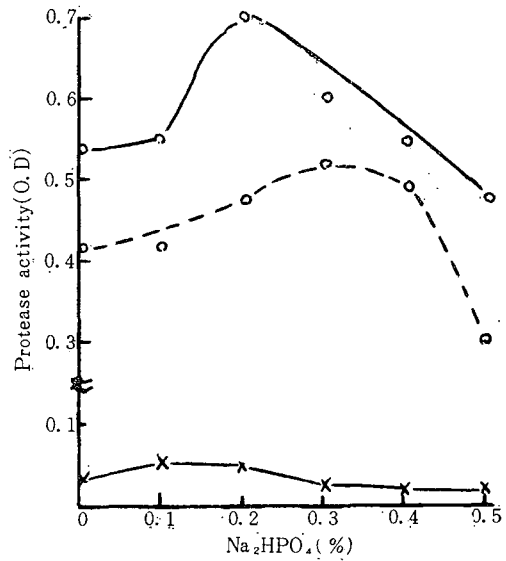


Fig. 7. Effect of Na₂HPO₄ on the protease production.

었고 鄭⁽³⁰⁾은 *Rhiz. japonicus* S-62의 acid protease 생산에 있어 wheat bran 에 NaH₂PO₄ 와 Na₂HPO₄의 0.2% 添加가 效果적이었다고 하였다. 이와같이 이들 磷酸鹽의 添加效果에 差異가 생기는 原因은 菌株의 差異에 基因되는 것으로 생각된다.

2. 粗酵素의 特性

1) 最適 pH

最適 pH를 알기 위하여 McIlvaine buffer soln. 과 Atkins & Pantin buffer soln. 을 사용하여 基質溶液의 pH를 소정 pH로 調節하고 活性을 測定한 結果는 Fig. 8과 같이 acid protease의 Opt. pH는 3.4, neutral protease는 7.2, alkaline protease는 9.0이었다.

森本등⁽¹¹⁾은 麴菌의 protease는 三種으로 分別하고 acid protease의 最適 pH는 3.0, neutral protease는 7.0, alkaline protease는 7.0~10.0이라고 하였으며, Bergkrist⁽⁴⁾는 *Asp. oryzae*의 protease를 protease I, II, III로 分離하고 casein을 基質로 할 때 protease I의 最適 pH는 8.2, II는 6.8, gelatin을 基質로 할 때 I은 9.0~9.5, II는 6.3, III는 4.5라고 하였다. 한편 松島⁽³¹⁾는 *Asp. oryzae*의 acid protease는 opt. pH가 3.0부근, neutral protease는 7.0부근, alkaline protease는 9.0~10.0이라고 하였는데 本 菌株가 生産하는 三種의 protease의 opt. pH도 松島의 結果와 대체로 비슷하였다.

2) 最適溫度

Casein soln의 pH를 最適 pH로 調節하고 30~60°C에서 活性을 測定한 結果는 Fig. 9와 같이 最適溫度는 alkaline protease와 neutral protease는 각각 40°C이고 acid protease는 45°C 부근이었다.

絲狀菌 protease의 最適 temp.에 관한 연구를 보면 *Asp. oryzae*⁽⁴⁾의 protease I과 II는 50°C, III는 45°C, *Asp. awamori* U-3⁽²⁷⁾의 acid protease의 最適 온도는 45°C 내의, *Rhiz. chinensis*⁽³²⁾의

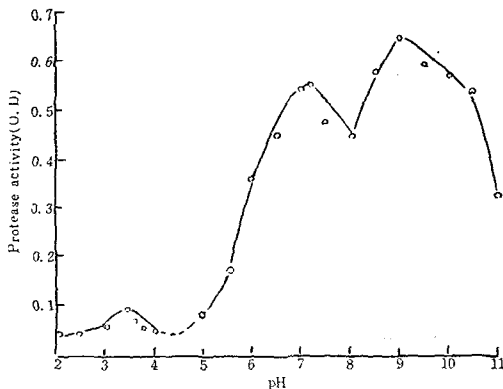


Fig. 8. Effect of pH on the protease activity

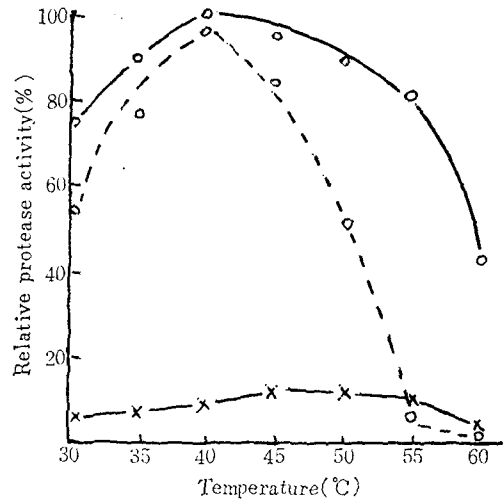


Fig. 9. Effect of Temperature on the protease activity

acid protease는 60°C로 대부분의 絲狀菌의 protease가 45~55°C인데 비하여 本 菌株의 protease는 最適溫度가 약간 낮은 편에 속한다.

3) 熱安定性

酵素液을 所定溫度에서 5分, 10分, 15분간 維持한 후 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 10, 11, 12와 같이 acid protease는 70°C에서 15분간, neutral protease는 60°C에서 10분간, alkaline protease는

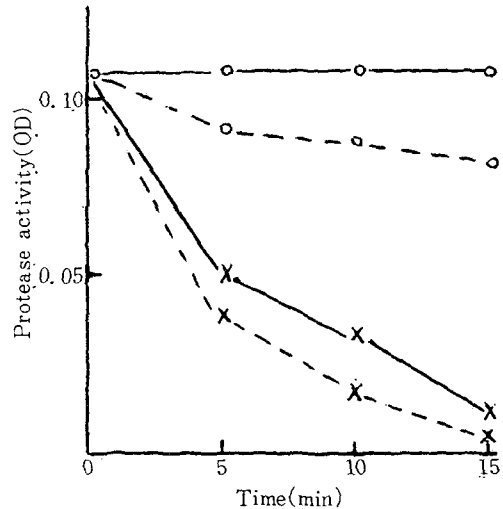


Fig. 10. Thermal stability of acid protease.

- 40°C
- 50°C
- ×—× 60°C
- ×---× 70°C

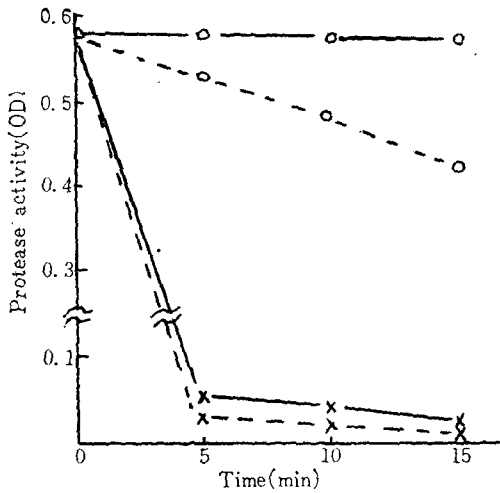


Fig. 11. Thermal stability of neutral protease.

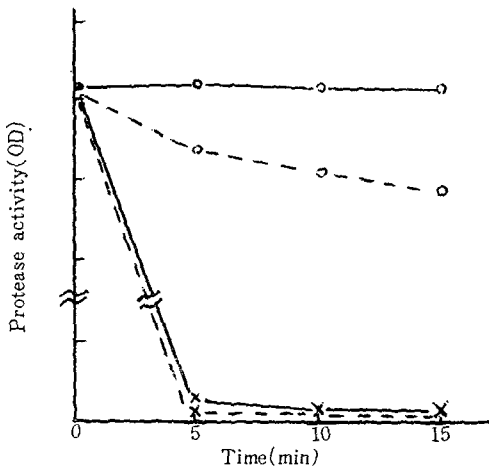


Fig. 12. Thermal stability of alkaline protease

60°C에서 5분간 처리하였을 때 거의的不活性化되었다.

*Asp. oryzae*의 acid protease와 alkaline protease⁽¹²⁾는 60°C에서 10분간 처리로 완전히失活되었고 *Asp. awamori* U-3의 protease⁽²⁷⁾는 60°C에서 10분간 처리로 약 55%가失活되었다고 하였다. 이와같이菌株에 따라熱安定성이 다른데本菌株가生産하는 acid protease는比較的耐熱성이強하나, neutral protease와 alkaline protease는耐熱성이弱한편에속하는것으로생각된다.

4) pH安定性

酸素液에 소정 pH의緩衝液을同量씩가하여 5°C에서 24시간放置한 후最適 pH로調節하고酸素의殘存活性를測定한結果는 Fig. 13과 같이

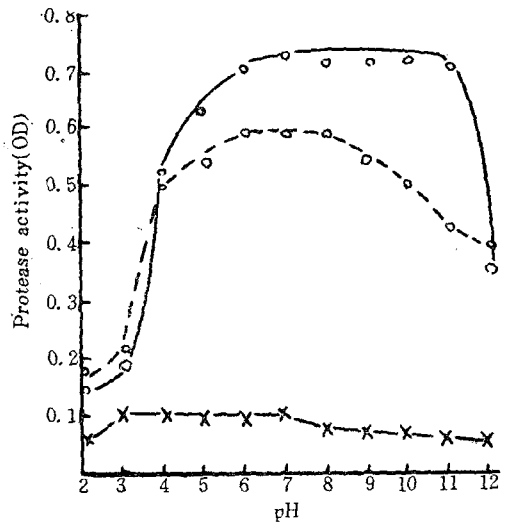


Fig. 13. pH stability of protease

本菌株의 acid protease는 pH 3.0~7.0, neutral protease는 pH 6.0~8.0, alkaline protease는 pH 6.0~11.0에서安定하였다.

絲狀菌 protease의 pH安定성에 관한연구를 보면 布川⁽¹²⁾은米麴의 acid protease는 pH 3.5~5.5 (45°C, 10分), alkaline protease는 pH 5.5~7.0 (44°C, 10分)이며 吉田⁽¹⁷⁾는 *Asp. saitoi*의 protease II는 pH 4.5~10.5, III는 pH 3.0~6.3이라고報告하였는데本菌株가生産하는 alkaline protease의安定 pH範圍가 다른菌株의酸素에 비하여 넓은 것이特徵이었다.

5) 耐熱性試驗

(1) 各種鹽類의影響

酸素液 1 ml에 各種鹽類를 10mg씩添加하여 55°C에서 10분간加熱處理한 후酸素의殘存活性를測定한結果는 Table 4와 같으며 各種鹽類中耐熱效果를 나타낸 것은 NaH_2PO_4 이었다.

朴⁽²⁷⁾은 *Asp. awamori* U-3의 acid protease에 대한耐熱性試驗에서 供試無機鹽類中 CaCl_2 와 CaSO_4 가 약간의耐熱效果를 나타내었다고 하였다. 그러나本菌株가生産하는 alkaline protease와 acid protease는 *Asp. sojae*의 alkaline protease⁽²⁰⁾와 *Asp. awamori* U-3의 acid protease와는 달리 Ca^{++} 은熱安定성에效果가 없었는데 이는菌株에 따른酸素의特性에基因되는 것으로생각된다.

(2) NaH_2PO_4 의添加量과耐熱性

酸素液 1 ml에 NaH_2PO_4 0~25mg을 넣어 55°C에서 10분간加熱處理한 후殘存活性를測定한結果는 Fig. 14와 같이 acid protease에 대하여는

Table. 4. Effect of various salts on the heat resistance of protease

Salts	Protease activity (O. D)		
	Acid protease	Neutral protease	Alkaline protease
KCl	0.051	0.331	0.229
KH ₂ PO ₄	0.070	0.190	0.347
K ₂ HPO ₄	0.021	0.099	0.220
K ₂ SO ₄	0.033	0.113	0.226
KNO ₃	0.069	0.096	0.225
CaCO ₃	0.023	0.115	0.240
(CH ₃ COO) ₂ Ca	0.021	0.170	0.358
Ca(NO ₃) ₂	0.032	0.155	0.336
CaSO ₄	0.033	0.184	0.399
CH ₃ COONa	0.038	0.121	0.251
NaCl	0.028	0.163	0.320
NaNO ₃	0.032	0.172	0.281
Na ₂ HPO ₄	0.030	0.102	0.240
NaH ₂ PO ₄	0.083	0.488	0.545
Non addition	0.073	0.378	0.444
Control	0.101	0.592	0.722

5 mg, neutral protease 와 alkaline protease 에 대하여는 10mg 이 最適 添加量이었다.

(3) 加熱時間의 影響

酵素液 1 ml 에 NaH₂PO₄ 10mg 을 添加하여 55° C 에서 10~30분간 加熱處理한 후 酵素의 殘存活性를 測定한 結果는 Fig. 15와 같다.

加熱時間이 길어짐에 따라 酵素의 活性는 漸次

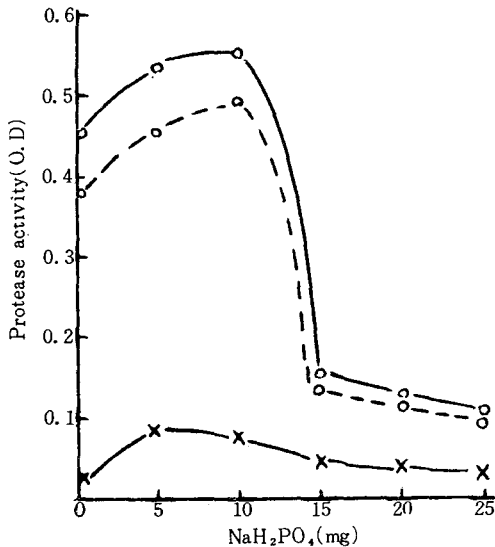


Fig. 14. Effect of NaH₂PO₄ on the heat resistance of protease.

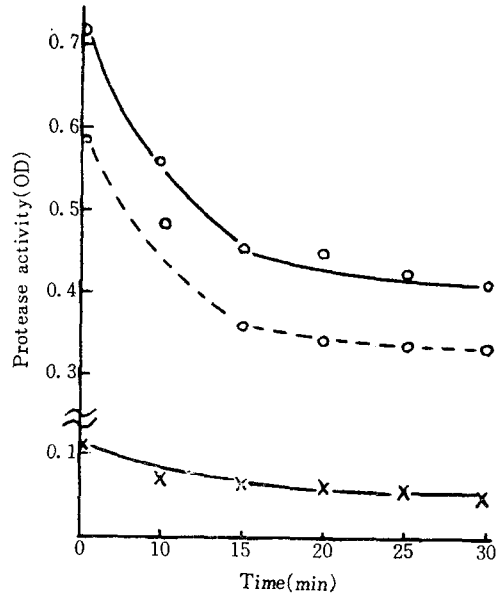


Fig. 15. Effect of heating time on the resistance of protease

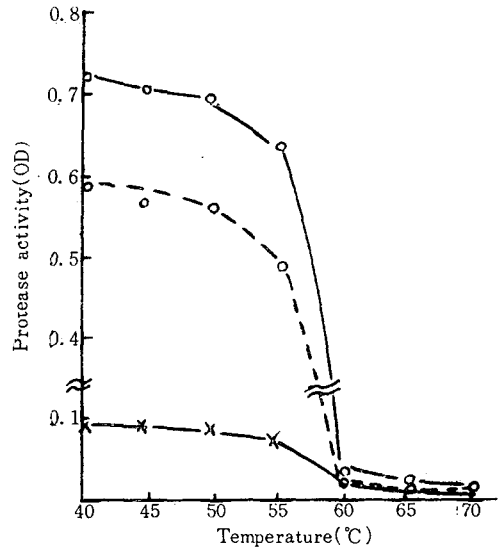


Fig. 16. Effect of temperature on the heat resistance

저하되어 30분간 加熱處理하였을 때의 殘存活性는 acid protease 는 55%, neutral protease 는 57%, alkaline protease 는 58% 이었다.

(4) 加熱溫度의 影響

酵素液 1 ml 에 NaH₂PO₄ 10mg 을 넣고 40~70° C 에서 10분간 處理하였을 때의 結果는 Fig. 16와 같으며 60° C 이상에서는 NaH₂PO₄의 耐熱效果를 거의 認定할 수 없었다.

要 約

Protease 의 生産能이 優秀한 *Asp. oryzae* KC-15 를 選定하고 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Wheat bran medium 에서의 最適培養時間은 acid protease 와 neutral protease 는 약 48시간, alkaline protease 는 약 72시간이었고 本 菌株가 生産하는 protease 는 alkaline protease 와 neutral protease 가 主體이며 acid protease 는 극히 微弱하였다.

2. Wheat bran medium 에 Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Glucose, rice powder 및 Na-glutamate 의 添加는 alkaline protease 와 neutral psotase 의 生産에, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, glucose 및 rice powder 의 添加는 acid protease 의 生産에 効果的이었다.

3. 粗酵素의 特性

Kinds	Acid protease	Neutral protease	Alkaline protease
Opt. pH	3.4	7.2	9.0
Opt. temp. (°C)	45	40	40
pH stability	3.0~7.0	6.0~8.0	6.0~11.0
Thermal stability	nearly inactivated for 15min. at 70°C	nearly inactivated for 10min. at 60°C	nearly inactivated for 5 min. at 60°C

4. 耐熱劑로서 NaH_2PO_4 가 가장 効果的이었으며 最適添加量은 alkaline protease 와 neutral protease 에 대하여는 10mg, acid protease 에 대하여는 5mg 이었다.

5. 60°C 이상에서는 NaH_2PO_4 의 耐熱效果는 거의 認定할 수 없었다.

6. NaH_2PO_4 10mg 을 添加하고 55°C 에서 30분 간 處理하였을 때의 殘存活性은 alkaline protease 는 약 58%, neutral protease 는 약 57%, acid protease 는 약 55% 이었다.

參 考 文 獻

1. Ichishima, E. and Fumiko, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 554 (1962).
2. 松島欽一: 日農工誌, **36**, 414 (1958)
3. 板本政義, 守隨稀雪: 日農工誌, **35**, 98 (1957).
4. Bergkvist, R.: *Acta Chemica Scandinavica*, **17**, 1541, 2239 (1963).
5. 赤堀四郎, 中西一夫, 藤井克美: 酵素化學シン

ボゾウム, Vol. 5, p. 95 (1950).

6. 鹽田日出夫: 日農化, **30**, 724 (1956).
7. 一島英治: 日農協誌, **22**, 393 (1964).
8. 蔭山公雄: 日農協誌, **33**, 53 (1955).
9. 金浩植, 李瑞來, 趙漢玉: 韓農化, **2**, 23 (1961).
10. 松島欽一: 日農化, **29**, 87, 883 (1955).
11. 森本輝彦, 照井堯造: *J. Ferment*, **38**, 307 (1960).
12. 布川彌太郎, 衣山陽, 難波康祐: 日農化, **36**, 879 (1962).
13. 元永和生, 三浦勇吉: 日農化, **32**, 422, 607 (1958).
14. 大谷義天, 石川行弘: *J. Ferment Technol.*, **47**, 20, 424 (1969).
15. 吉田文彦: 日農化, **28**, 66 (1954).
16. 吉田文彦: 日農化, **29**, 175 (1955).
17. Yoshida, F.: *Bull. Agr. Chem. Soci. Japan*, **20**, 252 (1956).
18. 好井久雄, 石原昭好: 日農工誌, **32**, 110 (1959).
19. 梁漢喆: 韓農化, **2**, 67 (1966).
20. 林和也, 寺田勝, 茂木孝也: 日農化, **45**, 310 (1970).
21. 嶋田協, 松島欽一: 日農化, **42**, 325 (1967).
22. 住江金之, 三浦二郎: 日農化, **31**, 73 (1956).
23. Anson, M. L.: *J. Gen. physiol.*, **22**, 79 (1938).
24. 萩原文二, 赤堀四郎: 酵素研究法 II (朝倉書店, 日本 東京, p. 240 (1956).
25. 萩原, 江上: 標準生化學實驗 (文光堂, 日本), p. 207 (1953).
26. Hakiyara, B., Matsubara, H., Nakai, H. and Okunuki, K.: *J. Biol. Chem.*, **45**, 185(1958).
27. 朴南圭: Thesis collection of the Graduate school (Chung-Buk University) **4**, 101 (1978).
28. 許元寧: Thesis collection of the Graduate school (Chung-Buk University) **3**, 71 (1977).
29. 鹽田日出夫: 韓農化, **9**, 89 (1977).
30. 鄭萬在: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **9**, 31 (1977).
31. 松島欽一: 日農化, **32**, 215 (1958).
32. Fukumoto, J., Tsuru, O. and Yamamoto, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 710 (1967).