

# 糸狀菌에 의한枸橼酸醱酵에 관한 연구

(第 I 報) 菌株의 分離 및 同定

成洛葵 · 金明燦 · 沈奇煥 · 鄭德和

慶尙大學校 食品加工學科

(1980년 2월 28일 수리)

## Studies on the Citric Acid Fermentation with Fungi

(Part I) Isolation and Identification of Strains

Nack kie Sung, Myung Chan Kim, Kie Hwan Shim and Duck Hoa Chung

Gyeong-Sang National University, Jinju, Korea

(Received February 28, 1980)

### Abstract

For the purpose of studies on the citric acid fermentation, 579 strains of *Aspergilli* were isolated from natural sources of microorganisms. Out of them, the strains of M-80 and M-315 which produced relatively larger amount of citric acid than any others were selected after carrying out an extensive screening test. The results obtained in light of the manual of Raper had been shown that the selected strains of M-80 and M-315 were identified as *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*, *Aspergillus ficuum*, respectively.

### 緒 論

오늘날 經濟의 高度成長과 더불어 醱酵工業은 눈부신 發展을 가져왔으며 有機酸 醱酵도 그 技術이 급속히 진보되어 amino 酸, 核酸醱酵工業과 함께 脚光을 받고 있는 分野로서 많은 研究가 기대되고 있다.

이들 有機酸中 酸味料, 醫藥品原料로서 그 수요가 해마다 늘고있는 枸橼酸은 파인애플, 柑橋等の 果實에서 얻어진 天然枸橼酸으로부터 始作하여 各種微生物이 糖類를 醱酵하여 集積한 枸橼酸을 生産하기에 이르렀다.

특히 醱酵法에 의한 枸橼酸은 TCA cycle의 中間生成物로서 一般의 菌의 정상적인 生育狀態에서는 축적되지 아니하며 枸橼酸分解에 關係하는 isocitric dehydrogenase와 aconitase의 酵素活性이

\*본연구는 1978년도 문교부 학술연구 조성비(정책과제)에 의한 것임.

거의 소실되고 대신 condensing enzyme (citric acid synthetase)의 活性이 初期의 약 10배 이상으로 급격히 증가하여 그 結果로 枸橼酸이 集積되는 것으로 밝혀졌다<sup>1)</sup>.

糸狀菌에 의한 枸橼酸醱酵에 관한 研究는 最初로 1893年 Wehmer<sup>2)</sup>가 *Citromyces*屬 두 菌株를 利用하여 CaCO<sub>3</sub>를 含有하는 蔗糖培地에서의 枸橼酸醱酵에 관한 報告文을 發表한 후 Zahoroski<sup>3)</sup>, Currie等<sup>4)</sup>을 거쳐 最近의 Marcris等<sup>5)</sup>에 이르기까지 많은 研究<sup>6-11)</sup>가 거듭되어 靜置法, 固體醱酵法 및 深部培養法等에 의해 대량생산되고 있는 실정이다.

한편 外國의 많은 研究와는 달리 國內에서는 尹等<sup>12)</sup>이 麴式培養에 있어서 有機酸과 amylase 生産條件의 차이점을 검토한 것과, *Hansenula anomala* var *anomala*를 分離選定하여 枸橼酸生成條件을 檢討한 吳等<sup>13)</sup>의 報文을 제외하고는 매우 미흡한 실정이다.

이러한 現實을 감안하여 著者等은 醱酵法에 의

한 枸橼酸生産에 必要한 基本的인 문제들을 檢討하기 위하여 一連의 實驗을 행하였으며 本報에서는 自然界로부터 枸橼酸生成能인 強한 菌株을 分離, 選定한후 同定하여 그 結果를 報告하는 바이다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 菌株의 分離 및 選定

#### 1) 1次分離

토양 및 靑果組合, 食品工場 등에서 채취한 各種 菌源試料로부터 다음과 같이 菌株分離를 하였다.

坂口等<sup>14)</sup>의 方法을 참조하여 分離하였다. 즉 7%의 枸橼酸이 첨가된 合成培地 (glucose 10%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.35%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%)를 petridish에 넣고 1 kg/cm<sup>2</sup> 하에서 15분 殺菌한후 菌源試料를 희석하여 30°C에서 평판배양을 하고 形成된 colony로부터 포자를 따서 Table 1과 같은 포자형성배지에서 사면배양을 한다. 그후 下記의 Currie等<sup>15)</sup>의 醱酵培地 15 ml를 대형시험관에 넣고 殺菌하여 7일간 사면배양시켰던 分離

菌의 포자를 1백금이 接種하여 表面培養을 한후 酸度비교 시험을 하여 強酸菌을 分離하였다.

Table 1. Composition of Sporulation Medium

Sucrose	140 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.48 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.8 mg
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.2 mg
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.0 mg
pH	5.0
Agar	20 g
D. W.	1 l

#### 2) 2次分離 및 選定

몇차례 반복하여 얻은 1次分離菌을 Table 2와 같은 여러가지 枸橼酸醱酵培地를 使用하여 表面 및 液內培養을 한후 酸度비교 시험을 하고 強酸性菌으로 認定되면 P. P. C. 法<sup>17)</sup>에 의해 定性試驗을 거쳐 비교적 枸橼酸만을 選擇의으로 生産하는 菌株을 選定하였다.

Table 2. Various Media Used for the Selection of Strains

MediumA <sup>15)</sup> : Sucrose 140 g, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2.5 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0 g, MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 0.25 g, D. W. 1 l, initial pH 3.5.
MediumB <sup>18)</sup> : Sucrose 100 g, NaNO <sub>3</sub> 3 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 g, MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 0.1 g, CaCl <sub>2</sub> 10 g, D. W. 1 l, initial pH 4.5.
MediumC <sup>16)</sup> : Sucrose 140 g, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.25 g, Fe <sup>++</sup> 7 mg, Zn <sup>++</sup> 2 mg, D. W. 1 l, initial pH 3.0.
MediumD <sup>19)</sup> : Glucose 120 g, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g, MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 0.5 g, Mn <sup>++</sup> 20 mg Fe <sup>++</sup> 10 mg, Methanol 20 ml D. W. 1 l, initial pH 6.5.
MediumE <sup>20)</sup> : Sucrose 140 g, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2.0 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.35 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.3 g, MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 0.2 g, Citric acid 0.4 g, D. W 1 l, initial pH 4.5.
MediumF <sup>21)</sup> : Sucrose 140 g, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2.5 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.5 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.25 g, Ca <sup>++</sup> 0.06 mg, Zn <sup>++</sup> 0.25 mg, Fe <sup>++</sup> 1.3 mg, Mn <sup>++</sup> 0.5 mg, D. W. 1 l, initial pH 4.0.

### 2. 選定菌의 同定

#### 1) 選定菌의 形態學의 特性

分離된 菌株中 우수한 枸橼酸生成菌으로 選定된 菌株을 Czapeck's 培地에 平板培養함과 同時에 사면배양을 하여 colony를 비롯한 각 기관의 형태를 鏡鏡하고 Raper等<sup>22)</sup>의 分類法에 따라 形態學上的 特性을 비교 관찰하였다.

#### 2) 選定菌株의 生理的 特性

##### ① 배양기의 종류에 따른 생육상태

各種培養法 즉 맥아즙한천배지, Pfetter 배지, 국즙한천배지, Czapeck's 배지, 감자배지 등을 pH 5.0으로 하여 petridish에 平판배양하여 5~15일간 生育狀態를 관찰하였다.

##### ② 各種질소원의 利用能力

Czapeck's 한천배지의 질소원 대신 各種 질소원

을 0.5%씩 첨가하여 30°C에서 평판배양하여 발육과 포자착생상태를 관찰하였다.

#### ③ 사멸온도

供試菌의 포자현탁액을 water bath에서 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 65°C, 70°C로 조절하여 30분간 처리한후 무균적으로 Czapeck's 배지에 접종하여 生育여부를 관찰하였다.

#### ④ 生育 pH

Czapeck's 배지의 pH를 0.5 N HCl 또는 0.5 N NaOH 로서 2~8로 조절한후 petridish에 平板培養하여 7일간 관찰하여 비교하였다.

### 3. 培養方法

分離菌의 枸橼酸生成能을 비교하기 위하여 表面培養은 各種 醱酵培地 50 ml씩을 250 ml 삼각 flask에 넣고 1 kg/cm<sup>2</sup> 하에서 15분간 殺菌하여 포자형성배지로부터 分離菌 1백금이씩을 접종하여 30°C 항온기에서 7일간 정치배양하였으며 液內培養역시 同一한 方法으로 殺菌한 배지에 菌을 접종시킨 다음 30°C에서 진탕배양하여 비교실험하였다.

### 4. 培養物의 分析

#### 1) 總酸

醱酵液 2 ml에 0.5% phenolphthalein 용액 한방울을 가한후 0.1 N NaOH 로서 적정하여 소비 0.1 N NaOH ml/배양액 ml로 나타내었다. (단 分析時 菌體를 씻어 배양액의 양을 배양전의 량으로 하여 적정하였다.)

#### 2) 枸橼酸의 定量

Acetic anhydride<sup>23)</sup>으로 하였다. 즉 배양물을 여과하여 적당히 희석하고(100~20 r/ml) 1 N HCl 로서 pH 2.0으로 조정하여 2 ml을 취하고 1% trichloroacetic acid 2 ml을 혼합하여 200 rpm에

서 5분간 원심분리하여 상청액 1 ml를 취한다. 다시 acetic anhydride 8 ml를 가하여 60°C water bath에서 10분간 방치하였다가 急冷하여 실온으로 한다음 1 ml pyridine을 가하여 60°C water bath에서 40분간 방치하고 ice bath에서 5분간 두었다가 420 nm에서 비색정량하였다.

3) paper chromatography에 의한 生成酸의 檢定 鈴木等<sup>17)</sup>의 方法을 참고로 하였다. 즉 세가지 종류의 배양물을 탈염하여 1% 포존산 용액과 함께 Whatman No. 1 여지에 spotting 한다. Ethylacetate: acetic acid; H<sub>2</sub>O (3:1:01)의 혼합액을 전개용매로하여 실온에서 약 22時間 전개시킨후 1주야 건조시켜 0.1% BPB alcohol 액을 발색시약으로 하여 spot를 확인하여 Rf치를 비교하였다.

#### 4) 기타 成分分析

환원당과 근체량은 常法으로 하였으며 pH는 D-5 pH meter 로서 측정하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 菌株의 分離 및 選定

#### 1) 1次分離

菌源試料로부터 强酸性培地에 耐性이 있는 菌株을 分離한 結果는 Table 3에서 보는 바와같이 579 菌株의 mold 중 表面培養에 의해 25% 이상의 총산을 生成하는 菌株은 11株 뿐이었고 약 53.4%가 배양액 ml 당 1~3 ml의 적정산도를 보이고 있었다.

특히 分離菌의 대부분이 흑국균이었으며 8株만이 백국균이었고 酸生成度는 菌株에 따라 크게 차이를 보이고 있었다. 尾崎等<sup>20)</sup>에 의하면 일반적으로 强酸菌의 形態的 특징은 포자수가 적고 흑색내지

Table 3. Occurrence of Citric Acid Producing Strains

Sources of isolated strains	Number of sample	Number of isolated strain	Number of strain per titrable acid		
			1~3 ml	3~5 ml	5 ml
Soil	262	413	211	175	9
Mushroom factory	26	46	23	23	
Makkulli factory	31	44	19	25	
Fruit market	15	26	13	11	2
Within the college	27	39	21	18	
Existing strains		11	6	5	
Total	361	579	309	259	11

**Table 4.** Comparisons of Titrable Acid Produced of Isolated Strains with Various Media  
(surface culture) (unit: ml)

NO. of strain	Medium	A	B	C	D	E
M-11		6.5	3.6	6.2	4.8	6.0
M-47		5.1	4.2	5.7	3.2	4.7
M-62		5.6	2.5	5.2	3.6	5.0
M-80		8.1	7.9	5.9	5.4	7.3
M-98		5.9	3.7	4.6	5.5	3.9
M-141		5.7	5.0	1.9	3.6	4.7
M-264		7.2	6.9	4.2	6.3	5.7
M-315		8.2	4.7	6.3	7.8	7.2
M-428		5.8	4.6	5.1	3.9	2.9
M-543		7.1	5.7	5.4	7.0	6.2
M-561		5.1	3.7	5.0	5.3	4.8

**Table 5.** Comparisons of Titrable acid Produced of Isolated Strains with Various Media  
(submerged culture) (unit:ml)

NO. of strain	Medium	A	B	C	D	F
M-11		2.9	2.4	2.8	2.2	3.4
M-47		4.8	3.1	3.6	4.9	4.7
M-62		2.0	2.0	2.2	1.2	1.8
M-80		2.0	2.3	1.7	1.6	2.1
M-98		2.4	2.6	2.3	1.9	2.9
M-141		2.3	2.0	1.7	2.7	2.4
M-264		1.9	1.7	3.0	1.6	2.2
M-315		5.6	4.6	5.0	4.0	5.7
M-428		2.3	2.5	1.3	2.5	2.7
M-543		2.2	2.7	3.0	2.5	2.1
M-561		3.1	2.3	3.4	2.8	3.6

암갈색이며 포자두가 대형이라고 하였으나 本實驗에서는 分離한 強酸菌들에 대해서 형태적 특징을 조사하지 않았다. 分離한 強酸菌 11株中 9株가 트양에서 分離한 것이었고 나머지 2菌株는 부패한 果實에서 分離하였다.

2) 2次分離

1次分離에서 얻은 強酸菌株 11株를 Table 2와 같은 여러가지 培地를 使用하여 表面培養 및 液內培養을 한 結果는 Table 4, Table 5와 같았으며 表面培養에 비해 液內培養의 結果가 아주 저조한 것은 培養條件이 맞지 않았기 때문이라 생각된다.

그러나 分離菌 M-80, M-263, M-543 등은 表面培養에서는 우수한 酸生成力을 나타내고 있었지만 液內培養에서는 아주 낮은 酸을 生成하고 있었는데 이는 堀井 등의 結果와 같았다. 그러나 M-315

의 경우는 이와는 달리 두가지 培養法에서 모두 우수한 酸生成力을 보이는 점이 특이하였다. 또한 各種培地에서 酸生成力이 다른 菌株에 비해 대체로 우수한 菌株는 表面培養時는 M-11, M-80, M-264, M-315, M-543 이었고 液內培養時는 M-11, M-47, M-98, M-315, M-561 이었다.

3) 菌株의 選定

위에서 얻은 8株의 菌株들을 培地 A 및 培地 F를 使用하여 7일간 表面 및 液內培養을 한후 培養物을 分析하여 枸橼酸生産에 적합한 菌株를 選定하였는데 그 結果는 Table 6과 같았다.

또 P.P.C. 法에 의한 培養物의 定性分析 結果 M-47, M-543은 枸橼酸이외의 酸을 상당히 生成하였고 나머지 菌株들은 대체로 枸橼酸만을 선택적으로 축적하고 있었는데 表面培養에 있어서는

Table 6. Comparisons of Second Isolated Strains

Cultural method	NO. of strain	Titration acid (ml)	pH	Sugar fermented (%)	Citric acid (mg/ml)	Yield (%)
Surface culture	M-11	6.1	1.86	74.2	40.2	28.7
	M-80	8.0	1.91	80.3	55.6	39.7
	M-263	7.9	2.03	81.7	51.9	37.0
	M-315	8.1	1.92	79.9	56.7	40.5
	M-543	7.2	1.89	81.2	47.2	33.7
Submerged culture	M-11	3.8	1.97	48.9	24.7	17.6
	M-47	4.7	1.92	51.2	19.2	13.7
	M-98	3.1	2.13	65.2	21.7	15.5
	M-315	5.6	1.89	68.7	39.2	28.0
	M-561	3.6	2.07	59.2	20.1	14.3

Table 7. Descriptive Sheet of *Aspergillus* Isolated from Nature.

Morphological characteristics		NO. of strain	M-80	M-315
Colony characteristics	rate of growth		ordinarily rapid spread	rapid spread
	texture		velvety	roughly velvety
	colour above		yellowish brown	black
	colour reverse		uncoloured	uncoloured or slightly yellow
Conidial heads	colour		light yellowish brown	brownish black
	shape		globose	globose
	size		70~300 $\mu$	100~300 $\mu$
Conidiophores	colour		colourless	colourless or pale brown
	marking		smooth but often rough	smooth
	length		2000~4500 $\mu$	1500~3500 $\mu$
	width		10~20 $\mu$	12~18 $\mu$
Visicles	colour		colour or pale yellow	yellowish brown
	shape		globose	globose
	size		50~68 $\mu$	45~60 $\mu$
	origine		substratum	substratum
Sterigmata			mostly two	mostly two
Primary sterigmata	colour		thin yellow	pale brown
	length		10~20 $\mu$	10~25 $\mu$
	width		3.5 $\mu$	4.9 $\mu$
Secondary sterigmata	length		4~7 $\mu$	6~9 $\mu$
	width		2.5~3.0 $\mu$	3.1 $\mu$
Conidia	colour		yellowish brown	coffee
	form		globose	globose
	size		3~5 $\mu$	4~5 $\mu$

M-80, M-315 가 각각 39.7%, 40.5%의 枸橼酸 을 生成하여 좋은 성적을 보였고 液內培養에서는 M-315 가 28.0%로서 가장 우수하였으므로 이들

을 각각 表面培養 및 液內培養用的 供試菌으로 選하여 이후의 實驗을 하였다.

2. 選定菌株의 同定

### 1) 形成學的性質

分離選정한 菌株들을 Raper 等<sup>22)</sup>의 分類法에 따라 Czapeck's 한천배지에 培養하여 形態學的性質을 관찰한 結果는 Table 7 과 같다.

Table 7 에서 보는 바와같이 分離菌 M-80 은 conidial head 의 색이 yellowish brown 이며 conidiophore 가 smooth 하고 약간 착색되어 있는 것을 볼 때 *Aspergillus wentii* group 과 비슷하였지만 conidial head 의 크기, biseriata 인 sterigmata 의 形態를 비교하여 볼 때 *Aspergillus wentii* group 의 어느 species 와도 일치하지 않았고 오히려 conidial head 의 색이 yellowish brown 으로서 *Aspergillus usamii* 가 변이한 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* 와 일치하였다. 일찌기 Karow 等은 *Aspergillus wentii* 를 利用하여 液內培養으로 枸橼酸을 生成한적이 있었지만 Raper 等에 의해 그 菌이 *Aspergillus niger* group 에 속하는 어떤 菌이 變異된 것이라고 밝힌적이 있다<sup>24)</sup>. 한편 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii* 는 耐酸性 amylase 를 분비하여 澱粉糖化力이 強하고 아울러 枸橼酸과 같은 有機酸生成能이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 이에 비해 分離菌 M-315 는 conidial head 가 흑색이며 conidiophore 는 smooth 할 뿐만 아니라 visicle 에 가까운 部分이 약간 착색되어 있고 sterigmata 가 2 단인 것으로 보아 *Aspergillus niger* group 에 속하는 것이 분명하였다. 이는 *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus niger*. V. Tiegh, *Aspergillus tubingensis* 等과도 약간 비슷한 점이 있었지만 Czapeck's 한천배지에서의 colony 성장이 빠르며 conidial head 가 아주 검게 착색되어 있고 conidiophore 의 길이가 약 3,000 $\mu$  전후로 길뿐만 아니라 visicle, conidia 의 形態, 크기, 색등을 비교할 때 *Aspergillus ficuum* 으로 추정되었다.

### 2) 選定菌株의 生理的性質

#### ① 培養基의 종류에 따른 生育狀態

培養基의 종류에 따른 生育狀態를 살펴본 結果 發育速度는 맥아즙한천배지, 국즙한천배지, Czapeck's 等이 좋았다.

#### ② 各種질소원의 利用性

Czapeck's 培地의 질소원 (NaNO<sub>3</sub>) 대신 各種 질소원을 첨가하여 그 利用性을 살펴본 結果 Table 8 에서 보는 바와같이 어느농도 NaNO<sub>3</sub> 를 利用하지 못하였다.

#### ③ 사멸온도

選定菌의 사멸온도를 살펴본 結果 모두 50°C 가

Table 8. Assimilation of Nitrogen Sources

NO. of strain	pH2~80		M-315	
	Growth	Spore	Growth	Spore
NaNO <sub>3</sub>	++	+++	+++	+++
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	+++	+++	+++	+++
NH <sub>4</sub> Cl	+++	+++	+++	++
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+++	+++	++	+++
NaNO <sub>2</sub>	—	—	—	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	++	++	++	+++
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	++	+++	+++	++
Peptone	+++	+++	+++	+++

※ Growth: —, absent; +, poor; ++, moderate; +++, thick. Spore: —, absent; +, scanty; ++, moderate; +++, abundant on whole mat.

지는 生育하였으나 M-80 이 M-315 보다 열에 대한 耐性이 조금 強하여 55°C 에서 生育하였고 60°C 이상에서는 두 菌株 모두 사멸하였다. 이는 尾崎 等<sup>25)</sup>의 枸橼酸生成菌株에 대한 實驗結果와 대체로 유사하였다.

#### ④ 生育 pH

pH 를 2~8 로 조절하여 두 菌株의 生育 pH 를 조사한 結果 대체로 pH 3~6 에서 양호하였으며 pH 2~8 에서 生育이 가능하였다.

## 要約

自然界로부터 枸橼酸生成能이 強한 菌株를 分離, 選定하여 同定한 結果는 다음과 같다.

1. *Aspergillus* 屬에 속하는 菌株 579 株를 分離하여 各種 實驗을 한 結果 表面培養으로는 分離菌 M-80, M-315 를, 液內培養으로는 M-315 를 供試菌으로 選定하였다.

2. 選定菌 M-80, M-315 를 Raper 等의 分類法에 따라 同定한 結果는 各各 *Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*, *Aspergillus ficuum* 으로 추정되었다.

3. 發育最適培地는 맥아즙한천배지였으며 M-315 는 55°C, M-80 은 60°C 에서 30분간 처리로서 각각 死滅되었고 生育 pH 는 대체로 pH 3~6 에서 양호하였다.

## 參考文獻

1) Lehninger; Biochemistry, Worth publishers,

- INC., p. 454 (1975)
- 2) C. Wehmer: *Comp. rend.*, **111**, 332 (1893)
  - 3) B. Zahorosk: *U. S. P.* **1, 066**, 358 (1913)
  - 4) J. N. Currie: *J. Biol. Chem.*, **31**, 15 (1917)
  - 5) B. Macris: *J. Biotechnol. Bioeng.*, **17** (9), 1973 (1975)
  - 6) K. Bernhauer, H. Knobloch and A. Iglauer: *Fio. Z.*, **309**, 151 (1941)
  - 7) 尾崎淺一郎, 原田良浩, 福本軍次, 竹下和夫, 渡邊達雄, 鈴木憲: *醸酵協會誌*, **14**, 457 (1956)
  - 8) 照井堯造, 芝崎勲: *醸酵工業雜誌* **35**, 105 (1957)
  - 9) M. J. Warkman and E. D. Karrow: *Ind. Eng. Chem.*, **39**, 821 (1947)
  - 10) I. D. Chughtai and T. K. Waker: *J. Biochem.*, **56**, 484 (1955)
  - 11) T. Tabuchi, M. Tanaka and M. Abe: *Agr. Biol. Chem.*, **42**, 440 (1968)
  - 12) 尹福鉉, 朴允仲, 李錫健: *韓國食品科學會誌* **6** (3), 127 (1974)
  - 13) 吳萬鎮, 朴允仲, 李錫健: *韓國食品科學會誌*, **5** (4), 215 (1973)
  - 14) 坂口謹一郎, 呷田靖次: *日本農化學講演* (1965)
  - 15) J. N. Currie: *J. Biol. Chem.*, **31**, 15 (1917)
  - 16) H. Horitsu: *J. Ferm. Associ. Japan*, **29**, 455 (1971)
  - 17) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尼裕之: *食品分析ハンドブック*, 建帛社, p. 328 (1969)
  - 18) 中澤亮治, 武田義人, 中野政弘: *日本農藝化學*, **13**, 52 (1937)
  - 19) S. Usamii, N. Saegusa and T. Tateishi: *J. Ferm. Assoc. Japan*, **29**, 33 (1971)
  - 20) 尾淺一郎, 福本軍次, 鈴木憲: *醸酵誌*, **13**, 134 (1955)
  - 21) M. J. Johnson and P. Shu: *Ind. Eng. Chem.*, **40**, 1202 (1948)
  - 22) K. B. Raper and Dorothy, I. Fennell: *The genus Aspergilli Krieger* (1973)
  - 23) M. Sattran and D. F. Densted: *J. Biol. Chem.*, **175**, 849 (1949)
  - 24) K. B. Raper and Dorothy, I. Fennell: *The genus Aspergilli Krieger*, p. 415 (1973)
  - 25) 尾崎淺一郎: *日本農藝化學會誌*, **29** (8) 611 (1956)