

Streptomyces chibaensis가 분비하는 이눌라아제의 精製와 特性

鄭 求英 · 朴 官和* · 李 啓瑞*

서울女子大學 食品科學科, 서울大學校 食品工學科*

(1981년 1월 26일 수리)

Purification and Characterization of *Streptomyces chibaensis* Inulase

Koo-Young Chung, Kwan Hwa Park* and Ke-Ho Lee*

Department of Food Science, Seoul Woman's College, Seoul 132-02

Department of Food Technology, Seoul National University, Suwon 179

(Received January 26, 1981)

Abstract

An inulase from *Streptomyces chibaensis* was purified about 120-fold with the yield of 38 % by ethanol precipitation, DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-200 gel-filtration. The purified enzyme showed the maximal activity at pH 6.5 and was fairly stable between pH 5.0~9.0. The enzyme was slightly activated by Mn^{++} , Mg^{++} and Co^{++} , and markedly inactivated by Hg^{++} and Ag^+ . The inulase was characterized as a typical endo-inulase which hydrolyzed inulin in a random manner and K_m for the inulin was $4.54 \times 10^{-4} M$.

序 論

1887년 Green이 발아중인 돼지감자 중의 글리세롤 추출물로부터 이눌라아제(inulase)가 존재한다는 것을 밝힌 이래 다알리아, 치코리, 돼지감자 등의 고등식물체에 이눌라아제가 존재한다는 사실이 알려졌고⁽¹⁻⁵⁾, 소라의 내장중에도 이눌라아제가 존재한다는 것이 알려졌으나, 강력한 이눌라아제는 미생물로부터 보다 쉽게 얻을 수 있어 이들에 대한 연구가 중요시되어 왔다. 1900년에 Linder가 *Saccharomyces maxianus*를 비롯한 몇몇 효모가 이눌린(inulin: β -(1 \rightarrow 2)-linked D-fructofuranose terminated by a nonreducing sucrose residue, n=32~34 fructose residues)을 격렬하게 발

효시킬 수 있음을 발견한 이래, 미생물 이눌라아제에 관한 많은 연구가 있었다. Snyder와 Phaff^(6,7)는 강력한 이눌라아제를 분비하는 *Kluyveromyces fragilis*의 배양 조건 및 이것이 분비하는 이눌라아제의 精製를 시도하여 그 작용기작을 報告하였고, Nahm^(8,9) 등도 이 효모가 분비하는 이눌라아제를 정제하여 그 성질을 규명한 바 있고 이밖에 *Candida kefyr*의 이눌라아제에 대한 연구등⁽¹⁰⁻¹³⁾이 있다. *Penicillium sp-1*^(14,15), *Aspergillus niger*⁽¹⁶⁻¹⁸⁾, *Penicillium glaucum*⁽¹⁹⁾이 분비하는 이눌라아제도 정제되어 그 特性이 규명되었다.

그러나 세균 이눌라아제에 관한 研究報告는 그렇게 많지 않다. 본 연구자들은 第1報⁽²⁰⁾에서 *Streptomyces*屬의 균주를 분리하여 이눌린을 생산하는 우수균주를 선발하여 이를 *Streptomyces chibaensis*로 동정

하고 이균주의 최적 배양조건을 규명한다. 본 실험에서는 이 균주가 분비하는 이눌라아제의 정제를 행하여 이 효소의 성질을 규명하였기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

材 料

炭素源으로서 이눌린은 일본 Wako 製 試藥을 使用하였고 효소기질用으로는 E. Merck(Darmstadt, Germany) 제품을 使用하였으며 fructose는 日本 Kokusan Chemical Works, Ltd에서 구입하였으며 DEAE-cellulose 이온교환수지는 Serva 사 (Heidelberg, Germany) 製를 사용하였다. Sephadex G-200은 Pharmacia Fine Chemicals(Uppsala, Sweden) 製이다.

酵素力價測定

가. 이눌린 分解力

0.1 M 인산완충용액(pH 6.5)으로 만든 2.0% 이눌린용액을 5分間 50°C의 恒溫槽內에서 定溫시킨 후 酵素液을 加하여 50°C에서 15분간 반응시킨 다음 100°C의 끓는 물에서 5分間 가열하여 반응을 중지시키고 생성된 還元糖을 Somogyi-Nelson 方法(21)에 의해 520 nm에서 吸光度를 測定하였다. 酵素 단위는 50°C에서 酵素液 1 ml 당 1分間에 1 μmole의 환원당(fructose)을 생성하는 것을 1단위로 하였다.

나. Saccharose 分解力

0.1 M 인산완충용액(pH 6.5)으로 녹여서 만든 5.0% saccharose 용액을 기질로 한 것 以外에는 실험 이눌린의 분해력의 경우와 同一한 方法으로 測定하였다. 단 酵素液 1 ml 당 1分間에 2 μmole의 還元糖을 생성하는 것을 1單位로 하였다.

酵素의 精製

가. 粗酵素의 調製

第 2 報(22)에서 보고한 바와 같은 이눌라아제 생산 최적배지에서 Streptomyces chibaensis 를 30°C, 84時間 진탕배양(Stroke 5 cm, Oscillation 120/min)한 후 5,000 ×g 로 60分間 냉동원심분리하여 얻어진 上澄液을 粗酵素液으로 使用하였다.

나. 알콜沈澱

粗酵素液에 冷에 탄을(-18°C)을 교반하면서 조금씩 加하여 30%(v/v)가 되도록 加한 후 30분간 10,000 ×g 에서 냉동원심분리하여 모든 上澄液에 다시 冷에 탄을(-18°C)을 70%(v/v)가 되도록 교반하면서 서서히 加한 후 다시 10,000 ×g 에서 30分間 냉동원심분리하였다. 이번에는 침전물을 모아 증류수에 용해하여 0.01M 인산완충용액(pH 7.0)에서 24時間 투석시켰다.

다. DEAE-cellulose 컬럼 크로마토그래피

투석튜브에 gum arabic 을 넣고 이것을 투석한 효소액 중에 담가 농축한 다음 효소액을 0.01 M 인산완충용액으로 평형시킨 DEAE cellulose 컬럼(1.3 × 35 cm)에 주입시킨 후 0.01 M 인산완충용액(pH 7.0) 100 ml 0.01 M 인산완충용액(pH 7.0)에 0.1 M NaCl, 0.2 M NaCl, 0.3 M NaCl 의 농도로하여 각 200 ml 를 농도순서대로 단계적으로 용출시켰다. 이때 용출속도는 시간당 20 ml 였으며 10 ml 劃分으로 받았다.

라. Sephadex G-200 에 依한 gel-filtration

DEAE-cellulose 컬럼크로마토그래피에서 얻은 효소액(27~33 번획분)을 농축시킨 후 Sephadex G-200 컬럼에 주입한 다음 0.01 M 인산완충용액으로 10 ml/hr 속도로 용출시켰다.

이상과 같은 정제방법을 Fig. 1에 도시하였다.

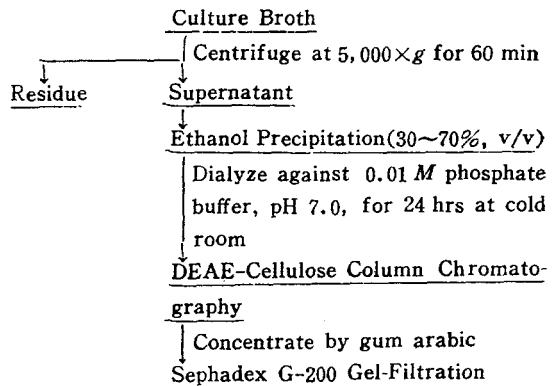


Fig. 1. Purification procedure of enzyme

단백질 농도 측정

Lowry 法(23)과 자외선부위의 흡광도법을 사용하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동

Davis 方法(24)을 이용하여 7.5%와 5.0% gel(pH 9.4)을 조제하여 pH 8.3의 tris-glycine 완충용액을 사용하여 튜브당 3 mA 를 걸어 polyacrylamide gel disc 전기영동을 행하였다. 전기영동이 끝난 gel 은 1% amidoblack 10B 용액으로 1시간 염색시킨 후, 7% 초산용액으로 탈색시켰다.

精製酵素의 一般의性質

各種 溫度에서의 時間에 따른 酵素分解力의 檢討, 最適 pH, pH 安定性, 金屬이온 및 阻害劑의 영향, 基質 特異性을 常法에 따라 檢토했다. 박층 크로마토그래피판 (20 × 20 cm)에 경시적으로 채취한 효소반응 생성물을 5 μl 씩 점을 찍어 가하여 1-propanol : ethylacetate : H₂O(2 : 2 : 1)로 전개한 후 케토오스(ketose)에 선택적으로 작용하는 urea-metaphosphoric acid 로 발색

Table 1. Summary of purification procedures of inulase

Procedure	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total activity	Specific activity (μ /mg protein)	Yield (%)	Purification fold
Culture filtrate	900	5.570	828	0.165	100	1.0
Ethanol precipitate 30~70%(v/v) and dialysis	143	0.613	751	8.567	90.7	51.9
DEAE-cellulose chromatography	70	0.290	383	18.867	46.3	114.3
Sephadex G-200 gel filtration	60	0.266	316	19.812	38.2	120.1

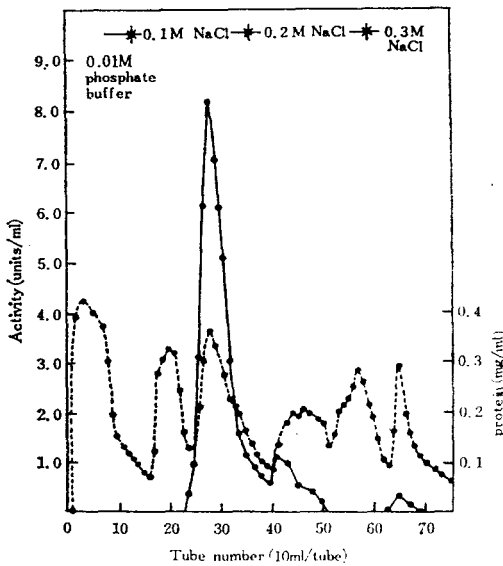


Fig. 2. Stepwise elution pattern of enzyme from *Streptomyces chibaensis* on DEAE cellulose column. Column size: 1.3×35 cm, flow rate: 20 ml/hr. DEAE cellulose was equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0). ○····○, protein; ●····●, inulase activity

시켜 당을 검출하였다. 단, 표준 이눌린 중간 분해산물은 이눌린 10g에 0.01 N HCl를 추가하여 100 ml로 만든 다음, 70°C의 항온조에서 30분간加水分解시키고, 다시 50% Na_2CO_3 로 중화하여 조제하였다.

結果 및 考察

酵素의 精製

30~70%(v/v)의 에탄올 劃分의 沈殿을 모아 DEAE-cellulose 컬럼에 흡착시켜, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M NaCl을 사용하여 단계적으로 용출시킨 결과는 Fig. 2

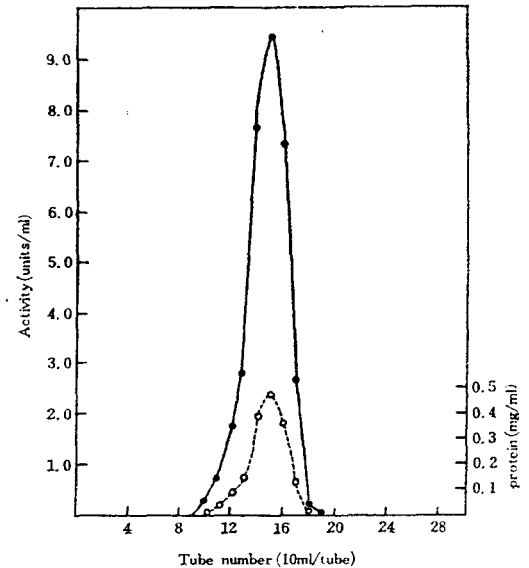


Fig. 3. Gel-filtration of the inulase on Sephadex G-200. A column of Sephadex G-200 (2.0×60 cm) was equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0). Elution was performed with the same buffer with a flow rate of 10 ml/hr. ○····○, protein; ●····●, inulase activity.

와 같다. 즉, 溶出曲線에서 볼 수 있는 바와 같이 3개의 이눌라아제帶가 存在하는 것을 알 수 있었다. 이들 3개의 이눌라아제帶中 0.1 M NaCl 농도에서 溶出되는 이눌라아제劃分을 모아 Sephadex G-200 컬럼에 주입하여, 0.01 M 인산완충용액 (pH 7.0)으로 10 ml씩 劃分하였다. 酵素力價와 단백질을 測定한 溶出曲線은 Fig. 3과 같다. 溶出曲線에서 酵素力價과 단백질帶가 잘 一致되는 것으로 보아 酵素가 高度로 精製되었음을 알 수 있다. 이러한 精製로써 Table 1에서 보는 바와 같이 比活性은 19.81 (unit/mg protein)로 약 120배 정제되었다. 最終精製酵素의 純도를 7.5% polyacrylam-

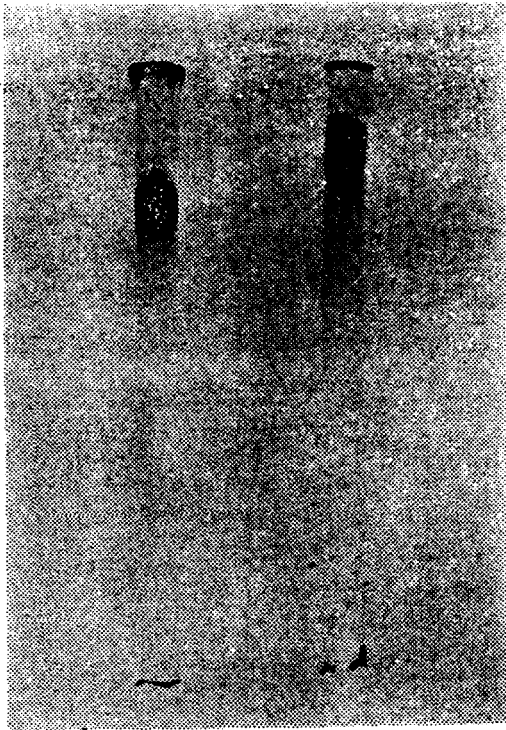


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of Sephadex G-200 preparation

- A : 5.0% polyacrylamide gel (running 3.5 hr at tris-glycine buffer solution at pH 8.3).
- B : 7.5% polyacrylamide gel (running 1.5 hr at tris-glycine buffer solution at pH 8.3).

ide gel (pH 9.4)과 5.0% polyacrylamide gel (pH 9.4)을 사용하여 전기영동한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 본精製酵素는 단일한 것으로 判斷할 수 있다.

Negoro 等^(12,13)은 *Candida kefyr*의 세포외 이눌라아제(extracellular)와 세포내 이눌라아제(intracellular)를 각각 28.5배, 55배 정제하였다. Nakamura⁽¹⁵⁾ 등은 *Penicillium* sp-1 菌株의 배양여액으로부터 성질이 다른 3種類의 이눌라아제를 분리하였다. 또한 *Aspeigillus niger*-12菌株로부터도 3種類의 세포외 이눌라아제가 존재함을 밝혔고 이중 2種류의 이눌라아제를 분리 정제하였다^(17,18). Fig. 2에서 보는 바와 같이 본 *Streptomyces chibaensis*가 生産해 내는 이눌라아제 역시 주된 1개와 작은 2개의 피크를 이루고 있는 것으로 미루어 단일한 이눌라아제만이 生産되지 않고 2種류 이상의 것으로 생각된다.

精製酵素의 一般의 性質

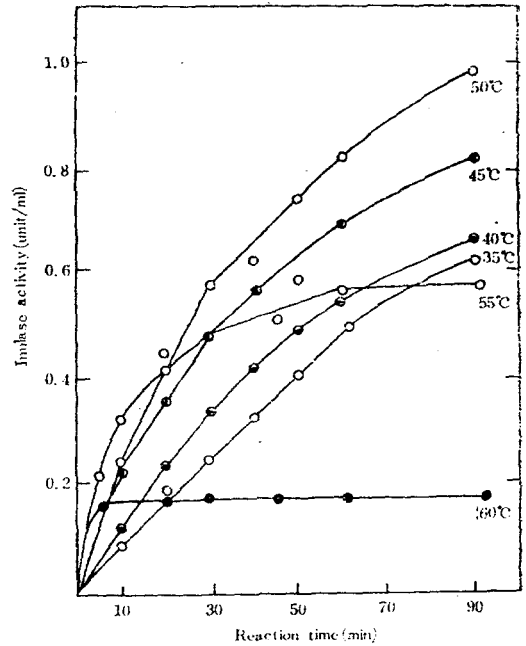


Fig. 5. Effect of temperature on inulin hydrolysis during incubation

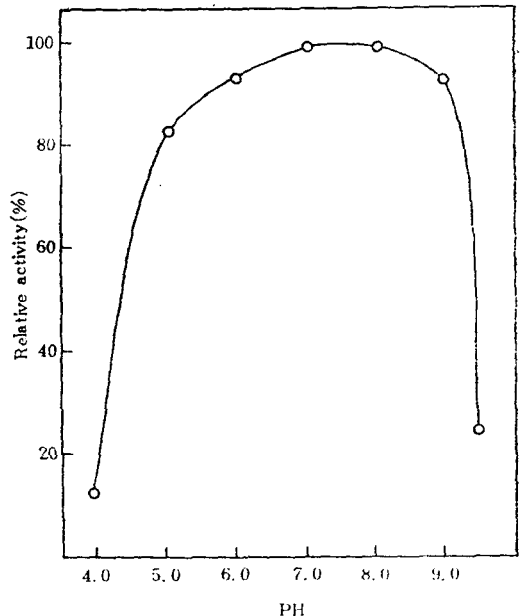


Fig. 6. Effect of pH on the activity of inulase
 Buffers used were 0.1 M acetate buffer (pH 4.5~5.5), 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0~7.5) and 0.1 M tris-HCl buffer (pH 8.0).

가. 반응온도 및 시간에 따른 이눌린의 분해
 반응온도를 달리하여 각각의 온도에서 經時的으로 酵素의 이눌린分解力을 測定한 結果는 Fig. 5와 같다. 50°C에서 가장 分解力이 컸으며, 60°C에서는 5分 以內에 酵素가 不活性化가 되기 시작하였다. 大部分의 微生物 이눌라아제는 44~55°C가 最適反應溫度인 것으로 보고되어 있는데 본 *Streptomyces chibaensis*에 의한 이눌라아제도 비슷한 경향을 보여주고 있다고 볼 수 있다.

나. 最適 pH

基質溶液의 pH를 4.0~9.0으로 調節하여 이눌라아제의 活性을 測定한 結果는 Fig. 6과 같다. 즉, 本 효소는 pH 5.5~7.0에서 높은 活性을 나타내고 있으며 最適 pH는 6.5로 볼 수 있다.

Kluyveromyces fragilis 이눌라아제는 pH 5.0~5.2⁽⁷⁾, 또는 pH 5.5⁽⁸⁾, *Candida kefyr*의 세포의 이눌라아제와 세포내 이눌라아제는 pH 4.5가 最適 pH라고 보고^(12,13) 되었고, *Aspergillus niger*의 세포의 이눌라아제 p-III⁽¹⁷⁾는 pH 5.8 그리고 p-I⁽¹⁸⁾은 pH 5.0, *Aspergillus* sp.(c-74 strain)⁽²⁵⁾는 pH 3.0이 最適 pH이며, 그밖의 植物體, 예를 들면 *Jerusalem artichoke* 이눌라아제⁽²²⁾는 pH 5.0 또는 pH 5.5, dandelion in-

ulase⁽⁵⁾는 pH 4라고 보고 되어 있다. 以上の 보고와 비교해 볼 때 本實驗에서 使用된 *Streptomyces chibaensis* 이눌라아제는 지금까지 알려진 이눌라아제 보다 훨씬 中性 쪽에 최적 pH를 가지고 있었다.

다. pH 안정성

所定の pH가 되도록 調節한 0.1 M 완충용액(20°C)에서 pH 안정성을 비교한 結果는 Fig. 7과 같다. pH 5.0~9.0 범위에서 安定하였고 pH 5.0 이하 또는 pH 9.5 이상에서는 安定성이 급격히 低下되었다.

Saccharomyces fragilis⁽⁹⁾는 pH 5.0~7.0에서, *Candida kefyr* 이눌라아제는 pH 4~8 범위에서 비교적 安定하였으나, 세포의 효소인 경우에는 pH 3.0이하, pH 9.0 이상의 pH에서는 活性이 크게 低下되었다는 研究報告가 있다. *Penicillium* sp-1 이눌라아제의 安定 pH는 4.0~6.0, *Penicillium glaucum* 이눌라아제⁽¹⁹⁾ 安定 pH는 4.0~7.0, *Aspergillus niger* 이눌라아제⁽¹⁷⁾는 pH 4.0~7.5에서 상당히 安定한 것으로 알려져 있다.

本 菌의 이눌라아제는 以上の 微生物 이눌라아제와 비교해 볼 때 pH 4.0 등의 酸性 pH에서 상당히 不安정한 반면, pH 8.0, pH 9.0 등의 알칼리성 pH에서 상당히 安定한 特性을 가지고 있었다.

라. 酵素活性에 미치는 金屬이온의 영향

酵素液에 CaCl₂·2H₂O, FeCl₂·6H₂O, BaCl₂·2H₂O, KCl, NaCl, MgCl₂·6H₂O, CoCl₂·6H₂O, MnCl₂·6H₂O, HgCl₂, AgNO₃ 등을 10⁻³ M이 되게 添加하여 30°C에서 1時間 維持시킨 후 酵素의 役가를 측정한 結果는 Table 2와 같다. 즉, Hg²⁺, Ag⁺ 이온에 의해 완전히 不活性化되는 반면, 기타의 金屬이온은 多少 차이가 있기는 하나, 효소의 活性에는 별다른 영향을 주지 않았다.

Candida kefyr^(12,13), *Penicillium* sp-1⁽¹⁵⁾, *Penicill-*

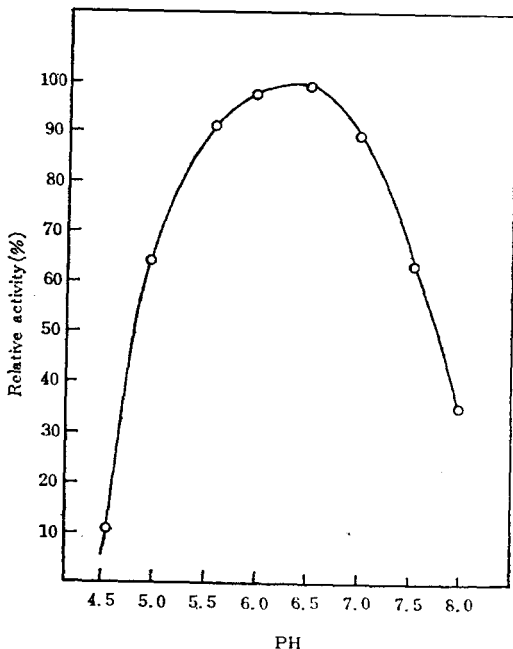


Fig. 7. Effect of pH on the stability of inulase
 The enzyme was incubated in various buffer(pH 4.0~5.0; 0.1 M acetate buffer, pH 6.0~7.5; 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0~9.5; tris-HCl buffer) at 20°C, 24hrs.

Table 2. Effect of various metal ions on inulase activity

Metal ions(10 ⁻³ M)	Relative activity (%)
None	100
Ca ⁺⁺	162
Fe ⁺⁺	160
Ba ⁺⁺	94
K ⁺	106
Na ⁺	100
Mg ⁺⁺	102
Co ⁺⁺	103
Mn ⁺⁺	105
Hg ⁺⁺	0
Ag ⁺	0

ium glaucum⁽⁹⁾, *Aspergillus niger*⁽¹⁷⁾ 등의 微生物이 이눌라아제는 정도에 따라 차이가 있기는 하지만 다같이 Ag^+ , Hg^{2+} 이온에 의해 크게 阻害되었고 또한 *Aspergillus* sp. (c-74 strain)의 이눌라아제도 Cu^{2+} , Sb^{3+} , Mg^{2+} 등의 金屬이온에 의해 阻害된다는 報告도 있다. 그리고 *Aspergillus niger* 이눌라아제에는 Mn^{2+} 이 活性化제로 作用하여 132% 活性을 나타내는가 하면 *Penicillium* sp-1 이눌라아제나 *Penicillium glaucum* 이눌라아제도 Mn^{2+} 에 의해 活性이 各各 127%, 120% 증가되었다는 보고에 비하여 本酵素는 影響을 받지 않는 것으로 볼 수 있다.

다. 基質特異性

이눌린, saccharose, raffinose, melezitose 를 基質로 하여 여기에 酵素를 作用시켜 酵素의 이눌린에 대한 分解力을 100으로 하여 相對的 活性을 求한 結果는 Table 3과 같다.

Table 3. Substrate specificity of inulase

Substrate	Relative activity (%)
Inulin	100
Sucrose	0.3
Raffinose	0.04
Melezitose	0

本酵素는 melezitose (3- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside)를 전혀 加水分解하지 못하는 것으로 미루어 α -glucoside 을 가지고 있지 못함을 알 수 있으며, 한편 sucrose 의 分解力과 raffinose 의 分解力이 극미한 것으로 보아 β -fructofuranosidase (invertase)의 능력도 없는 것 같다.

Kluyveromyces fragilis⁽⁶⁾, *Penicillium*⁽¹⁵⁾ 菌株가 분비하는 이눌라아제는 melezitose 分解力은 가지고 있지 않으나 강력한 saccharose 分解력을 동시에 가지고 있고 raffinose 및 levan 分解력을 가지고 있는점, 그리고 加水分解 中間生成物중에서 oligofructoside 를 檢出할 수 없었다는 점을 들어 이들을 exo 型의 효소로 이눌린의 말단 D-fructosyl unit 로 부터 fructose 단위로 分解하는 효소라고 하였다.

그밖에 *Candida kefyr*^(12,13), *Lactobacillus plantarum*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* (p-Ⅱ) 등이 분비하는 이눌라아제는 강력한 sucrose 分解력을 동시에 갖고 있다는 사실로 미루어 역시 exo 型의 효소인 것으로 보고 있다.

그러나, 本酵素는 invertase 능력이 상당히 적은 것으로 보아 일반적인 微生物 이눌라아제와는 성질이 다를 수 있다.

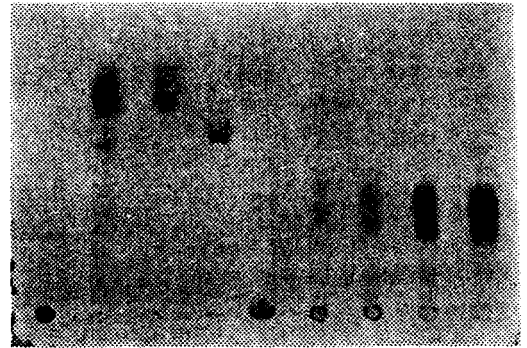


Fig. 8. Thin layer chromatogram of hydrolysate of inulin at various reaction time

- 1; inulin 2; Standard(inulin hydrolysate)
- 3; fructose 4; sucrose 5; 30 min
- 6; 1 hr 7; 2 hr 8; 6 hr 9; 32 hr

Nakamura⁽¹⁷⁾ 등은 *Aspergillus niger* 가 분비하는 p-Ⅱ 이눌라아제의 독특한 기질 특이성 및 반응기작을 보고한 바 있는데 本 실험에서 研究된 효소 역시 Nakamura 등이 보고한 endo 型 이눌라아제와 상당히 유사한 特性을 가진 것으로 생각된다. 또한 박충크로마토그래피를 利用하여 經時적으로 채취한 이눌린 分解 산물을 분리하여 本 酵素의 이눌린에 대한 作用機작을 본 結果는 Fig. 8과 같다. 반응을 개시하여 2시간까지는 fructose, sucrose 등의 重合도가 1~2인 당류는 檢출되지 않았다. 반응시간이 경과함에 따라 重合도가

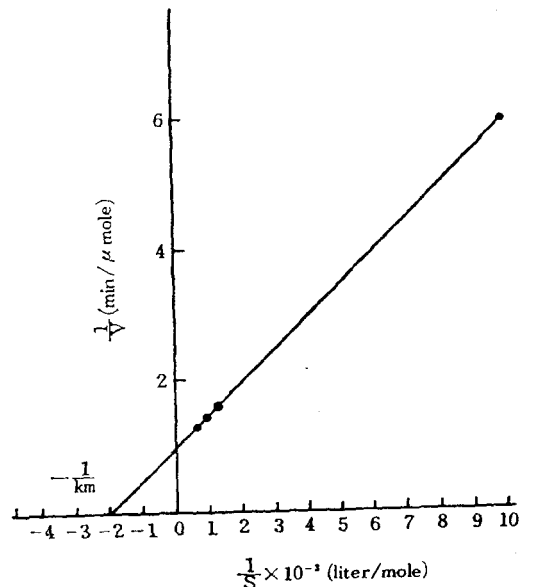


Fig. 9. Lineweaver-Burk plot of hydrolysis of inulin by inulase

큰 이눌린의 중간분해 산물이 다량으로 검출되고 있으며, 미량이지만 반응시간이 경과됨에 따라 重合도가 1~2인 당도 검출되었다.

따라서 本 酵素는 重合도가 큰 이눌린分子의 내부를 불규칙하게 절단하여 몇몇 종류의 oligosaccharide 를 형성하는 전형적인 endo 型의 이눌라아제라 생각된다.

바. 基質濃度와 反應速度

이눌린溶液의 농도를 0.05%~5%로 변화시켜 이눌린의 초기분해속도를 측정하고 이눌린농도와와 關係를 Lineweaver-Burk 의 方法에 따라 圖示한 結果는 Fig. 9와 같으며 그래프로부터 求한 酵素의 이눌린에 대한 Michaelis Menten Constant(Km)는 $4.54 \times 10^{-4} M$ 이었다. 이때 이눌린의 평균분자량은 5680으로 하였다.

Nakamura 등⁽¹⁵⁾은 *Penicillium* 속 균주가 분비하는 3種類의 이눌라아제의 Km 값은 p-I 은 $1.73 \times 10^{-4} M$, p-II 는 $2.33 \times 10^{-4} M$, p-III 는 $1.5 \times 10^{-3} M$ 이었다. *Aspergillus* 屬 균주가 분비하는 이눌라아제는 $1.25 \times 10^{-3} M$ 이라 보고되어 있다. 本 酵素도 Nakamura 등이 구한 Km 값과 비슷하나 *Aspergillus* 屬 이눌라아제의 Km 값 보다는 낮은 것으로 나타났다.

要 約

Streptomyces chibaensis 로부터 분비하는 이눌라아제를 一連의 에탄올 침전, DEAE-cellulose 칼럼 크로마토그래피 및 Sephadex-200 gel filtration 方法에 依해서 120배 분리정제하였고 정제된 효소의 최적 pH는 6.5이고 pH 5.0~9.0 범위내에서는 비교적 안정성을 보였다. 효소는 Mn^{++} , Mg^{++} 및 Ca^{++} 의 존재하에서는 약간 활성화되었고, Hg^{++} , Ag^{++} 의 존재하에서는 강한 비활성화를 보였다. 정제된 효소는 endo 型으로 Km 값은 $4.54 \times 10^{-4} M$ 이었다.

文 獻

1. Edlmann, J. and Bacon, J. S. D. : *Biochem. J.*, **49**, 446 (1951)
2. Edlmann, J. and Jefford, T. G. : *Biochem. J.*, **93**, 148 (1964)
3. Edlmann, J., Dickerson, A. G. : *Biochem. J.*, **98**, 787 (1966)
4. Flood, A. E., Rutherford, P. P. and Weston,

- E. W. : *Phytochemistry*, **9**, 2431 (1967)
5. Rutherford, P. P. and Deacon, A. C. : *Biochem. J.*, **126**, 569 (1972)
6. Snyder, H. E. and Phaff, H. J. : *J. Microbiol. Serol.*, **26**, 433 (1960)
7. Snyder, H. E. and Phaff, H. J. : *J. Biol. Chem.*, **237**, 2438 (1962)
8. Nahm, B. H. and Byun, S. M. : *Korean Biochem. J.*, **10**, 95 (1977)
9. Byun, S. M. and Nahm, B. H. : *J. Food Sci.*, **43**, 1871 (1978)
10. Negoro, H. and Kito, E. : *J. Ferment. Technol.*, **50**, 136 (1972)
11. Negoro, H. and Kito, E. : *J. Ferment. Technol.*, **51**, 96 (1973)
12. Negoro, H. and Kito, E. : *J. Ferment. Technol.*, **51**, 103 (1973)
13. Negoro, H. : *J. Ferment. Technol.*, **51**, 879(1973)
14. 中村豊彦, 帆足信一郎 : 日農化誌, **43**, 599 (1969)
15. 中村豊彦, 中津誠一郎 : 日農化誌, **51**, 681 (1977)
16. 中村豊彦, 帆足信一郎, 中津誠一郎 : 日農化誌, **52**, 105 (1978)
17. 中村豊彦, 黒川隆則, 中津誠一郎, 上田誠之助 : 日農化誌, **52**, 159 (1978)
18. 中村豊彦, 丸本誠一, 中津誠一郎, 上田誠之助 : 日農化誌, **52**, 581 (1978)
19. 金奇哲 : 博士學位論文, 忠北大學 (1979)
20. 李啓瑚, 鄭求英, 朴性五 : 學術院論文集, 自然科學篇, **19**, 267 (1980)
21. Somogyi, M. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952)
22. 鄭求英, 李啓瑚, 朴性五 : 韓農化, **24** (1981), in press
23. Lowry, O. H., Resebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, W. H. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
24. Davis, B. J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 305 (1964)
25. 權泰鍾, 鄭鎬權, 姜正源, 徐正垣 : 韓產微誌, **1**, 37 (1973)
26. Avigad, G. and Bauer, S. : *Methods in Enzymology*, **8**, 621 (1966)