

微生物에 의한 5'-GMP의 生産에 관한 研究

第 2 報. 5'-XMP aminase 生産균주인 *Brevibacterium ammoniagenes* BA 17-2 의 생육도

金雨淵 · 孔雲泳 · 孫忠弘 · 裴鍾燾 · 柳洲鉉*

第一製糖株式會社 食品研究所, *延世大學校 食品工學科

(1981년 5월 25일 수리)

Studies on the Fermentative Production of Guanosine-5'- Monophosphate by Microorganism

Part II. Growth responses of 5'-XMP aminase producing *Brevibacterium ammoniagenes* BA 12-7

Woo-Yeon Kim, Un-Young Kong, Choong-Hong Son,
Jong-Chan Bae, and Ju-Hyun Yu*

Cheil Sugar Co., Ltd, Foods R. & D. Center, Seoul, Korea

*Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

Abstract

Growth responses of *Brevibacterium ammoniagenes* BA 17-2, which had been obtained by the treatment of several mutagens in our previous report, were investigated to select the preliminary optimal concentrations of phosphate, Mg^{++} , Mn^{++} , and thiamine for the production of 5'-XMP aminase. In this experiment it was shown that the concentration of phosphate in the medium has an important effect on the growth of microorganism. Using the medium containing 0.2% of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3mg/l of $MnSO_4 \cdot H_2O$, and 1 mg/l of thiamine-HCl, the maximum cell mass was obtained at the concentration of 0.4% of KH_2PO_4 and K_2HPO_4 , respectively. Above the concentration of these phosphates, cell growth was inhibited as the phosphate concentration increased to 1%, but the inhibition was overcome by the addition of 1% of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 3mg/l of thiamine-HCl. The 5'-XMP aminase activity was also influenced by the concentration of phosphate, Mg^{++} , Mn^{++} , and thiamine. In addition, the optimal culture pH and temperature for the enzyme activity were found to be 6.8 and 32°C, respectively.

緒 論

Monosodium glutamate 와 맛의 상승 효과를 나타내는 guanosine-5'-monophosphate(5'-GMP) 는 *Penicillium* 속¹⁾ 또는 *Streptomyces* 속²⁾ 등의 微生物이 생산하는 phosphodiesterase 로 RNA를 분해하거나, *Bacillus* 속의 變異株에 의하여 培地 中에 축적된 guanosine 을 인산화시켜^{3),4)} 5'-GMP 를 회수하는 방법과 xanthosine-5'-monophosphate (5'-XMP)를 생산하는 미생물을 혼합 배양 하여 5'-GMP를 만드는 발효 방법^{5),6)}으로 생산되고 있다. 열거한 방법의 하나인 *Brevibacterium ammoniagenes* 의 변이주를 이용한 혼합 배양법에서는 5'-GMP 이외에 guanine 이나 guanosine 및 guanosine diphosphate 또는 guanosine triphosphate 등이 동시에 생산되므로 5'-XMP 만을 생산하는 5'-XMP aminase 생산균의 개발이 필요하게 되었다.

著者 등은 前報⁷⁾에서 5'-XMP aminase 의 生産能이 높고 5'-GMP reductase 나 nucleotidase

의 활성이 없는 *Brevibacterium ammoniagenes* 의 adenine 요구주 BA 17-2의 분리 및 생성물의 동정결과를 보고한 바 있다. 本實驗에서는 일반적으로 핵산관련물질의 醱酵에서 중요한 영향을 미친다고 알려져 있는 培地成分인 무기인산염 및 마그네슘염⁸⁾과 기타 망간이온 등 미량원소⁹⁾ 등이 5'-XMP aminase 生産菌의 生育에 미치는 영향과 아울러 5'-XMP aminase 역가와의 관계를 비교 고찰하였다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6871 의 변이주로서 biotin-adenine 영양요구성이며 5'-GMP reductase 를 生産하지 않고 5'-XMP aminase 의 生産능력이 높은 *Brevibacterium ammoniagenes* BA 17-2⁷⁾를 사용하였다.

2. 培 養

인산염 및 마그네슘이온, 망간이온, thiamine 의 농도가 생육에 미치는 영향은 Table 1 의 (A)

Table 1. Composition of media

Compounds	Seed medium	Fermentation medium (A)	Fermentation medium (B)
Glucose	50g/l	100g/l	180g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1g/l	0.1g/l	0.1g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20mg/l	10mg/l	10mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1mg/l	1mg/l	1mg/l
Cysteine	20mg/l	20mg/l	20mg/l
Yeast extract	10g/l	1g/l	1g/l
Casein hydrolyzate	—	1g/l	1g/l
Ca-pantothenate	10mg/l	10mg/l	10mg/l
Urea	5g/l	6g/l	—
Peptone	10g/l	—	—
KH ₂ PO ₄	1g/l	—	10g/l
K ₂ HPO ₄	1g/l	—	10g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1g/l	—	10g/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	3mg/l	—	3mg/l
Thiamine·HCl	5mg/l	—	3mg/l
Biotin	30μg/l	30μg/l	30μg/l
Adenine	—	60mg/l	60mg/l

* pH was adjusted to 7.2 with 5N NaOH before sterilization

(A) medium for flask culture

(B) medium for 5l jar fermentor culture

배지에 여러가지 농도의 상기 영양성분을 첨가한 후 500ml의 진탕 배양용 삼각 후라스크에 30ml를 분주하고 120°C에서 15분 가압 멸균하여 BA 17-2 菌株의 1 백균이를 接種하고 30°C에서 24시간 동안 rotary shaker (180rpm)에서 진탕 배양한 후 균체 생육량을 측정하여 조사했다. 균체 증식과 효소 역가에 미치는 pH 및 온도의 영향과 최적배양 pH와 온도조건에서의 인산염, 마그네슘이온, 망간이온, thiamine의 영향은 3l의 발효배지를 넣고 120°C에서 20분간 가압 멸균한 5l jar fermentor (Marubishi MD-30)에 30°C에서 24시간 진탕 배양한 種菌培養液을 발효배지의 10% (V/V) 용량으로 植菌을 한 후 32°C에서 통기 배양하면서 경시적으로 균체량과 5'-XMP aminase 역가를 측정하여 조사했다. 배양은 通氣量 1 VVM 및 교반속도 900 rpm의 조건에서 행하였으며 pH는 암모니아수로 자동 조절하였다.

3. 5'-XMP aminase 역가 測定

5'-XMP aminase의 역가는 Moyed & Magasanik¹⁸⁾의 方法을 변형시켜 측정하였다. 즉 pH 7.4의 0.1M 인산완충액에 녹인 0.017M ATP 0.6ml와 0.05M XMP 0.6ml 수용액을 25ml 삼각 후라스크에 넣고 여기에 0.8ml의 BA 17-2의 배양액을 세척한 균을 Sonic Dismembrator Artek-300에서 14KC로 20분 동안 파괴하여 첨가한 후 0.8M MgCl₂와 0.16M (NH₄)₂SO₄의 혼합액 0.5ml를 넣고 37°C 수조에서 진탕하면서 반응을 시작하였다. 30분 후 3.5% perchloric acid 27.5ml를 넣어 반응을 정지시키고 이 반응액을 여과하여 XMP 용액 대신에 증류수를 넣은 Blank에 대한 이 여액의 흡광도를 290nm에서 측정하였으며 1 unit는 30분 동안에 흡광도 0.1을 변화시킬 수 있는 효소 역가로 정의하였다.

미생물 균체량은 常法¹⁸⁾에 따라 정량하였으며 乾燥菌體量(DCW, mg/ml)으로 표시하였다.

實驗結果

1. 인산염과 마그네슘이온이 생육에 미치는 영향

최대의 5'-XMP aminase의 역가를 얻기 위한 *Brevibacterium ammoniagenes* BA 17-2의 최적배양의 예비조건을 구하기 위해 5'-IMP 생성균인 *Brevibacterium ammoniagenes*의 생육에는

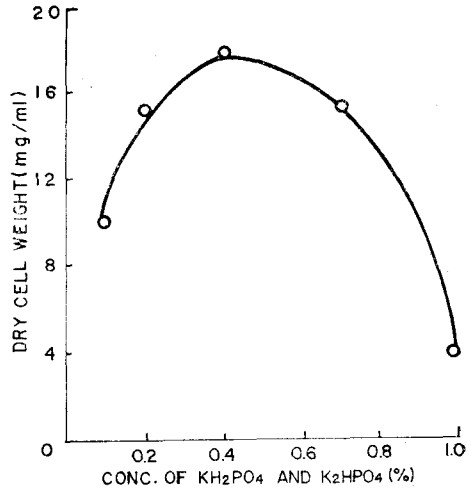


Fig. 1. Effect of phosphate concentration on cell growth. Medium; (A) medium containing 0.2% of MgSO₄·7H₂O, 3mg/l of MnSO₄·H₂O, and 1mg/l of thiamine·HCl

저해물 주나 5'-IMP 生産에는 필수적인 인산염이 *Brevibacterium ammoniagenes* BA 17-2의 생육에 미치는 효과를 살펴보았다. KH₂PO₄와 K₂HPO₄의 농도에 따른 BA 17-2의 생육도는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. (A)배지에 MgSO₄·7H₂O가 0.2%, MnSO₄·H₂O가 3 mg/l, thiamine·HCl이 1mg/l 되게 첨가한 다음 KH₂PO₄와 K₂HPO₄를 각각 0.2%에서 1.0%까지 첨가하여 배양한 후 건조균체량을 측정해 본 결과 각각 0.4%에서 DCW가 17.6mg/ml로 균체 증식이 가장 양호하였으며 인산염 농도가 증가하면 오히려 균체량이 저해되어 KH₂PO₄와 K₂HPO₄ 각각 1.0%의 경우에는 DCW가 3.9mg/ml로 감소되었다. (Fig. 1). 또한 KH₂PO₄와 K₂HPO₄ 각각 0.2%와 1.0%의 두가지 경우에 대해 MgSO₄·7H₂O를 0.2%에서 1.0%로 첨가하여 배양한 결과 마그네슘이온이 일정한 농도에 이르면 생육저해 현상이 사라졌다(Fig. 3). KH₂PO₄와 K₂HPO₄ 각각 0.2%의 경우에 MgSO₄·7H₂O 0.2%를 첨가하면 건조균체량이 급격히 증가되어 0.7% 첨가에서는 최대 17mg/ml에 이르렀으며, KH₂PO₄와 K₂HPO₄ 각각 1.0% 첨가의 경우에는 MgSO₄·7H₂O 0.4%에서부터 급격히 증가되어 0.7% 첨가에서 최대 18.6mg/ml로 나타났다. 즉 각각 0.2%의 인산염 농도보다 1.0%의 인산염 농도에서 생육저해의

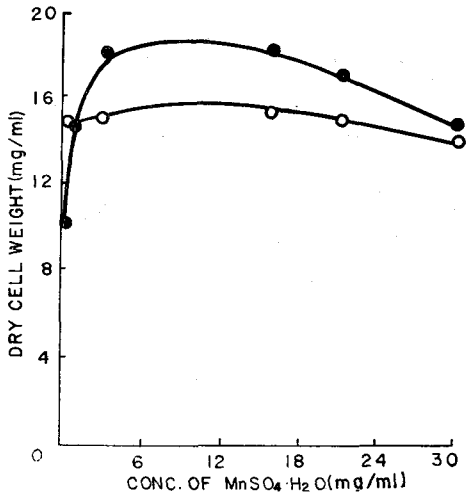


Fig. 2. Growth response to Mg^{++} at different concentrations of phosphate
 Growth medium; (A) medium containing 3mg/l of $MnSO_4 \cdot H_2O$ and 1mg/l of thiamine-HCl
 ○—○ : 0.2% of KH_2PO_4 , and K_2HPO_4 , respectively
 ●—● : 1% of KH_2PO_4 and K_2HPO_4 , respectively

회복에 높은 마그네슘이온을 요구하므로 高濃度 인산염을 첨가한 배양에 마그네슘이온이 필수적임을 알 수 있다 (Fig. 2.)

2. 망간이온이 생육에 미치는 영향

$MnSO_4 \cdot H_2O$ 의 농도에 따른 균의 생육도는 Fig. 2와 같다. (A) 배지에 thiamine-HCl이 1 mg/ml 되게 첨가한 다음 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 각각 0.2%와 각각 1.0% 첨가했을 때 망간이온의 농도 변화에 따른 생육량을 조사해 본 결과 인산염과 마그네슘이온이 저농도일 경우 망간이온의 농도에 따라 菌體 증식에 뚜렷한 변화가 없으나 인산염과 마그네슘이온이 고농도일 경우에는 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 가 3mg/l일 때 菌體 증식이 양호하였으며 30mg/l일 때는 오히려 저해되었다. $MnSO_4 \cdot H_2O$ 를 첨가하지 않으면 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 각각 0.2% 첨가했을 때가 각각 1% 첨가했을 때보다 菌體 증식이 양호하지만 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 농도가 3mg/l로 증가하면 後者が 급격히 菌體량이 증가함을 알 수 있어 망간이온이 高濃度の 인산염과 마그네슘이온이 존재하는 배지에서 양호한 菌體 증식에 필수적임을

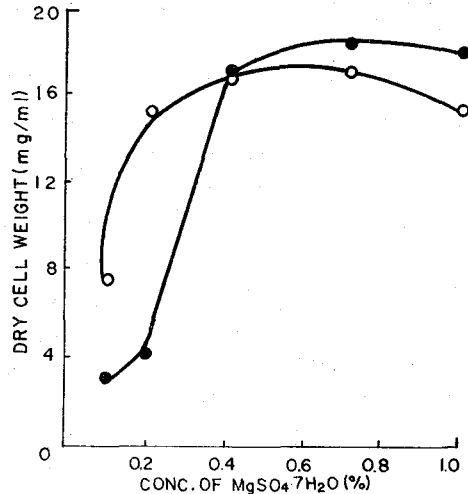


Fig. 3. Growth response to Mn^{++} at different concentrations of phosphate and Mg^{++}
 Growth medium; (A) medium containing 1mg/l of thiamine-HCl
 ○—○ ; 0.2% of KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, respectively
 ●—● ; 1% of KH_2PO_4 , K_2HPO_4 and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, respectively

알 수 있다.

3. thiamine 이 생육에 미치는 영향

(A) 배지에 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 를 3mg/l 농도로 첨가한 다음 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 각각 0.2%와 1% 첨가했을 때 Fig. 4에서 보는 바와 같이 양자 모두 thiamine 농도가 증가함에 따라 菌體生育이 증가하였다. 각각 0.2%의 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 첨가의 경우에는 thiamine-HCl의 농도가 1mg/l에서 菌體生育이 최대가 되고, 각각 1.0% 첨가의 경우는 thiamine-HCl 3mg/l에서 菌體生育이 최대로 되어 高濃度 인산염 마그네슘이온에서 thiamine 요구량이 증가되었다.

4. 生育과 酵素力價와의 관계

배지 중의 인산염, 마그네슘이온, 망간이온, thiamine의 농도가 菌體生育에 중요한 영향을 미치는 것을 알았다. 앞에서 최적으로 결정된 인산염, 마그네슘이온, 망간이온, thiamine 농도의 (B) 배지를 사용하여 5l jar fermentor에서 배양 pH와 온도에 따른 菌體生育과 5'-XMP aminease의 역가를 비교 검토하였으며 결정된 최적 pH와 온도에서 배양하여 인산염, 마그네슘이온,

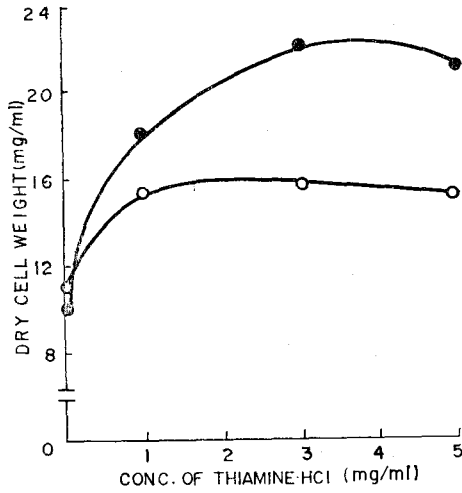


Fig. 4. Effect of thiamine at different concentrations of phosphate and Mg^{++}
Growth medium; (A) medium containing 3mg/l of $MnSO_4 \cdot H_2O$
○—○; 0.2% of KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, respectively
●—●; 1% of KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, respectively

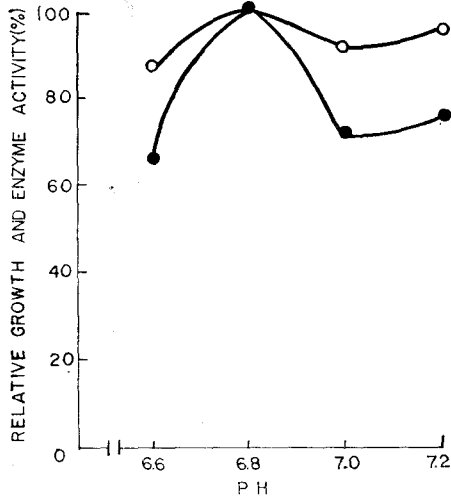


Fig. 5. Effect of pH on cell growth and enzyme activity
○—○; cell growth
●—●; enzyme activity

망간이온, thiamine이 菌體生育과 효소역가에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 5는 (B) 배지에서 32°C로 배양할 경우 菌體生育과 효소역가에 미치는 배양 pH의 영향

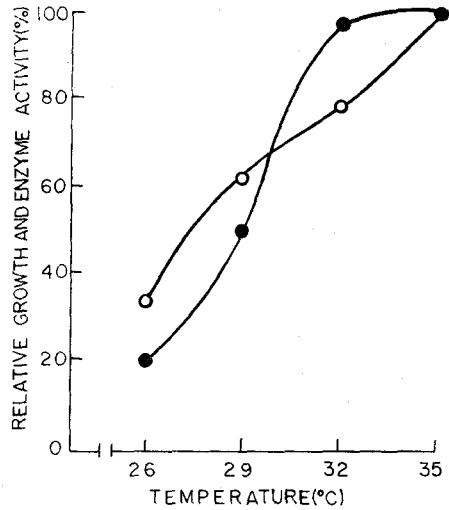


Fig. 6. Effect of temperature on cell growth and enzyme activity
○—○; cell growth
●—●; enzyme activity

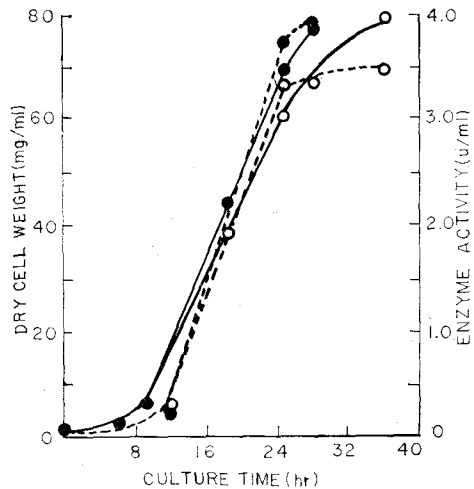


Fig. 7. Effect of phosphate, Mg^{++} , Mn^{++} , and thiamine on cell growth and enzyme activity in 5l jar fermentor

○; Fermentation medium (B) except 0.2% of KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ respectively, 1mg/l of $MnSO_4 \cdot H_2O$, and 1mg/l of thiamine-HCl
●; Fermentation medium (B)
— : cell growth
..... : enzyme activity

을 나타낸 것이다. pH 6.8에서 菌體生育이 가장 좋았고 효소역가도 높아 효소역가와 菌體量과의 상관관계가 있음을 알 수 있었으나 pH 6.8 이상

이 되면 菌體量에 비해 효소역가가 급격히 떨어 짐을 알 수 있었다.

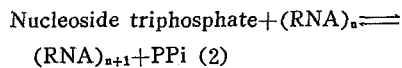
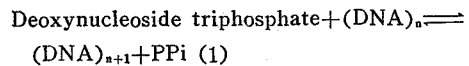
Fig. 6은 pH 6.8에서 배양할 경우 배양온도의 菌體生育과 효소역가에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 29°C 이하에서는 菌體生育이 저조하였으며 菌體量에 거의 비례하여 효소역가도 낮게 나타났다. 효소역가는 32°C, 35°C 배양에서 동일하게 최대로 나타났으나 균체당 당 효소역가는 32°C 배양에서 높게 나타났다.

Fig. 7은 (B) 배지와 (B) 배지 중 KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O를 각각 0.2%, MnSO₄·H₂O를 1mg/l, thiamine·HCl을 1mg/l로 한 배지를 사용하여 pH 6.8과 32°C로 배양했을 때의 균체량과 효소역가의 변화를 나타내고 있다. 前者의 발효배지 (B)를 사용한 경우는 배양시간이 28시간으로 後者보다 8시간 짧았으며 後者인 경우 前者와는 달리 배양 24시간 이후 5'-XMP aminase의 역가가 균체증식에 비해 증가하지를 않았다.

考 察

Nara 등²⁰⁾은 *Micrococcus sodensis*와 *Arthrobacter citreus*에 의한 5'-IMP 생성 연구에서 배지성분 중에 KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄를 각각 1% 첨가한 경우에 5'-IMP가 최대로 생성되었으나, 균체증식은 *Micrococcus sodensis*에서는 각각 0.2%의 배지를 사용한 배양에서 최대이며 *Arthrobacter citreus*에서는 각각 0.3%를 사용한 배양에서 최대로 나타났다고 보고하였다. 또한 *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872의 아데닌 요구변이주를 사용한 5'-IMP 醱酵에서 KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O 각각 1%에 비타민이 풍부한 yeast extract를 1% 첨가한 배지에서 균체증식과 5'-IMP 生成이 모두 최대로 나타남을 발표했고⁹⁾ 합성배지의 경우 1%의 KH₂PO₄, K₂HPO₄를 사용하면 균체증식이 저해되거나 적정농도의 MgSO₄·7H₂O에 의해 저해현상이 해체되며 그외에 망간이온, thiamine, pantothenate도 해체효과를 가지며 그 기작은 뚜렷하지 않다고 報告하였다.¹⁰⁾ 本研究에 사용한 *Brevibacterium ammoniagenes* BA 17-2의 培養에서도 인산염에 의해 생육이 저해되었으나 마그네슘이온, 망간이온, thiamine을 첨가해주면 生育 저해현상은 사

라졌다. 高濃度の 인산염에 의한 生育 저해현상은 微生物의 증식에 필수적인 DNA replication에 관계하는 DNA polymerase (E.C. 2.7.7.7)의 반응 (1)과 transcription에 관계하는 RNA polymerase (E.C. 2.7.7.6)의 반응 (2)이 모두 가역반응이므로 inorganic pyrophosphate (PPi)가 사라지지 않으면 역반응이 일어나는 것이 기인하는 것 같다. inorganic pyrophosphate를



pyrophosphate + H₂O \rightleftharpoons 2orthophosphate (3) 분해하는 inorganic pyrophosphatase (E.C. 3.6.1.1)는 (3)의 반응에서와 같이 가역반응이므로 인산염의 농도가 높을 경우 역반응이 진행되므로 inorganic pyrophosphate가 분해되지 않는다. 따라서 培地中の 인산염의 농도가 증가하면 DNA replication과 transcription이 진행되지 않아 菌體의 증식이 이루어지지 않는다. 鄭²¹⁾은 동결한 *L. lactis*를 37°C에서 90분간 인산완충액에 방치할 경우 세포막이 손상되며 인산염 농도와 pH에 따라 RNA가 대부분인 260nm에서의 흡광물질이 유출되어 菌의 活性도가 떨어지는 때 이러한 현상은 특히 0.1% 이상의 pH 7.0 인산완충액에서 현저하였고 이에 醱素가 관계하는 것 같다고 報告하였다. 이로부터 세포의 活性이 떨어져 증식이 일어나지 않는 현상은 인산염 농도에 의해 저해되는 효소반응과 관계가 있음을 알 수 있다.

5l 발효조에서 通氣를 하면서 온도 pH 등을 일정하게 유지시켜 배양해 본 결과 인산염, 마그네슘이온, 망간이온, thiamine의 저농도 첨가 培地에서는 고농도 첨가의 培地에서와 최종 균체농도는 동일하나 배양시간이 8시간이나 길어지며 배양말기부터 5'-XMP aminase의 生成이 현저하게 둔화되었다. 증식에 비례하여 5'-XMP aminase 역가가 어느 시기까지는 높아져 균체와 5'-XMP aminase 역가와 상관관계가 있는 것 같으나 인산염, 미량원소, 비타민의 농도와 배양조건에 따라서 균체당 효소역가가 달라짐을 알 수 있다. 따라서 최대의 효소역가를 얻기 위해서는 一次的으로 균체증식을 고려하여야 하지만 인산염등의 배지성분과 배양의 최적조건을 찾아야 할 것이다.

抄 錄

前報에서 변이치리에 의해서 얻은 *Brevibacterium ammoniagenes* BA 17-2 로 부터 5'-XMP aminase 를 生産하기 위하여 인산염, 마그네슘이온, 망간이온, thiamine 의 예비적정농도를 定하고자 生育度를 조사했다. 本實驗에서 培地中の 인산염의 濃度가 菌의 生育에 중요한 영향을 미치는 것을 보여주었다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2% $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3mg/l, thiamine·HCl 1mg/l 를 포함한 培地를 사용하면 최대 균체량은 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 각각 0.4%의 농도에서 얻어졌다. 이러한 인산염 농도 이상에서 菌生育은 인산염 농도가 1% 까지 증가함에 따라 저해되었지만 저해작용은 1%의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 3mg/l 의 thiamine·HCl 을 첨가하여 해소되었다. 5'-XMP aminase 역가도 역시 인산염, 마그네슘이온, 망간이온, thiamine의 농도에 영향을 받았다. 그밖에 효소역가에 대한 배양 최적 pH 와 온도는 각각 6.8 과 32°C 로 밝혀졌다.

參考文獻

1. Kuninaka, A., Otsuka, S., Kobayashi, Y. and Sakaguchi, K.: Agr. Biol. Chem., 23 : 239 (1959)
2. Ogata, K., Nakao, Y., Igarashi, S., Okumura, E., Sugino, Y., Yoneda, M. and Suhara, I.: *ibid.*, 27 : 110 (1963).
3. Nogami, I., Kida, T. and Yoneda, M.: *ibid.*, 32 : 144 (1968).
4. Kinoshi, S. and Shiro, T.: *ibid.*, 32 : 396 (1968).
5. Furuya, A., Abe, S. and Kinoshita, S.:

- Biotechnol. Bioeng., 13 : 229 (1971).
6. Furuya, A., Okachi, R. and Takayama, K.: *ibid.*, 15 : 795 (1973).
7. 배종찬, 손충홍, 공운영, 유을현 : 한국산업미생물학회지, 7(3) : 127 (1979).
8. Nara, T., Misawa, M., and Kinoshita, S.: Agr. Biol. Chem., 31 : 1351 (1967).
9. Nara, T., Misawa, M. and Kinoshita, S.: *ibid.*, 32 : 1153 (1968).
10. Nara, T., Komuro, T., Misawa, M., and Kinoshita, S.: *ibid.*, 33 : 1030 (1969).
11. Nara, T., Misawa, M. Komuro, T. and Kinoshita, S.: *ibid.*, 33 : 1198 (1969).
12. Furuya, A., Abe, S. and Kinoshita, S.: *ibid.*, 34 : 210 (1970).
13. Kato, F., Furuya, A., and Abe, S.: *ibid.*, 35 : 1061 (1971).
14. 배종찬, 공운영, 손충홍, 장 옥, 유주현 : 한국산업미생물학회지, 7(3) : 119(1979)
15. Abe, S. and Udagawa, K.: Japanese patent Publicaion 41-12673 (1966).
16. Komuro, T., Nara, T. and Misawa, M.: Agr. Biol. Chem., 33 : 230 (1969).
17. Misawa, M., Nara, T., Udagawa, K., Abe, S. and Kinoshita, S.: *ibid.*, 33 : 370(1969).
18. Moyed, H.S. and Magasanik, B.: J. Biol. Chem., 226 : 351 (1957).
19. Nakayama, K., Suzuki, T., Sato, Z. and Kinoshita, S.: J. Gen. Appl. Microbiol., 10 : 133 (1964).
20. Nara, T., Misawa, M., Komuro, T. and Kinoshita, S.: Agr. Biol. Chem., 31 : 1224 (1967).
21. 정현도 : 한국과학원 석사학위논문 (1980).