

黑麴菌의 人工變異에 關한 研究

朴 允仲 · 孫 天培
忠南大學校 食品加工學科
(1982년 1월 16일 수리)

Studies on the Mutation of *Aspergillus niger*

Yoon Joong Park and Cheon Bae Sohn

Department of Food Science and Technology, Chungnam National
University, Daejeon 300-01

(Received January 16, 1982)

Abstract

Several mutants were isolated from the parent strain of *Aspergillus niger* CF: the first mutant strain CF-11 was obtained by UV irradiation, and the second mutant strain CF-21 and CF-22 were from NTG (N-methyl-N'-nitroso-N-nitroso-guanidine) treatment on the CF-11. These mutants were characterized, and their enzyme and acid production on wheat bran Koji and wheat flour Koji were studied.

Asp. niger CF-22 mutant appeared to be tan type which conidial heads were discolored. Its glucoamylase activity was increased approximately two times and its α -amylase about 50 percent as compared with that of the parent strain of *Asp. niger* CF, when grown on wheat bran Koji under the optimal conditions.

Asp. niger CF-21 mutant showed slower growth rate and poor sporulation than the wild type, although its conidial heads were not discolored. Approximately 4-fold increment in its acid production was observed as compared with the wild type.

The activities of glucoamylase and α -amylase of the *Asp. niger* CF-22 and CF-21 mutants were higher than those of the wild type, but their protease activity was rather lower.

The maximum production of glucoamylase by the *Asp. niger* CF-22 mutant was obtained after 2 to 3 days incubation on wheat bran at 30 to 35°C; α -amylase 2 days incubation at 30 to 35°C.

The maximal levels of acid production by the mutant CF-21 was appeared after 2 days incubation on wheat bran Koji, and after 3 days on wheat flour Koji at 30°C. Little differences in the levels of acid production were observed between on wheat bran and flour Koji.

序 論

黑麴菌中에는 酵素生産, 구연산生産 등 産業界에서 利用되고 있는 菌株가 많으며 이들 菌의 生産能力을

向上시키기 위하여 自然의 分離源에서 보다 強力한 菌株를 分離하거나 人工變異에 의하여 우수 變異株를 얻으려고 하는 研究가 많이 이루어졌다. 黑麴菌의 人工變異에 關한 研究로서는 *Aspergillus niger*에 關한 中澤 등⁽¹⁾, Zahi 등⁽²⁾, 堀井 등⁽³⁾, Cardner 등⁽⁴⁾, 松

島 등⁽⁵⁾의 報告와 *Aspergillus usamii*에 關한 假塚 등⁽⁶⁻⁷⁾의 報告 및 *Aspergillus awamori*에 關한 新井 등⁽⁸⁾의 報告가 있다.

人工돌연變異를 일으키는 데 여러가지 物理的 方法과 化學的 方法이 使用되고 있으며 有用한 變異菌株를 얻기 위해서는 한 가지 變異方法을 使用하는 경우와 몇 가지 變異方法을 組合하는 경우가 있다. Penicillin 生産菌株인 *Penicillium chrysogenum*의 變異株 育成⁽⁹⁾, 간장製造用 麴菌인 *Aspergillus sojae*의 變異株 育成⁽¹⁰⁾ 등에 있어서는 變異方法의 組合과 連次的 選擇法이 實用化되었다.

黑麴菌에는 種類가 많고 人工變異株도 多樣하게 誘導될 수 있으므로 現在 使用되고 있는 黑麴菌 또는 그 變異株보다 우수한 菌株를 分離 또는 育成할 수 있을 것으로 期待된다. 따라서 著者 등은 수집한 黑麴菌中에서 글루코아밀라아제 (glucoamylase)가 강한 *Aspergillus niger* CF를 親株로 하여 紫外線照射法과 NTG (N-methyl-N'-nitro-Nitroso-guanidine) 處理法의 組合에 依하여 글루코아밀라아제 生産과 酸生成面에서 우수한 變異株의 育成을 試圖한 바 特徵이 있는 二株의 變異株를 얻었으며 또한 이들에 대하여 몇 가지 酵素와 酸生成 條件을 檢討하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

使用菌株

保存하고 있는 黑麴菌과 自然界에서 分離한 黑麴菌을 밀기울培地에 麴式으로 培養한 後 글루코아밀라아제 活性과 酸生成力을 測定하고 그中에서 글루코아밀라아제 活性이 강한 *Asp. niger* CF(以後 CF菌株라 略稱한다)를 單胞子分離한 다음 人工돌연變異의 親株로 使用하였다. 한편 글루코아밀라아제 生産菌으로 使用되고 있는 *Asp. usamii*의 變異株인 *Asp. usamii mut. shirousamii* RI-B11(以後 RI-B11 菌株라 略稱한다)를 對照菌株로 使用하였다.

變異 方法

가. 紫外線照射

CF菌을 麥芽汁寒天斜面에 接種하여 30°C에서 6~7日間 培養한 後 胞子 1白金耳를 取하여 10 ml의 液菌水에 옮기고 vibrator로 5分間 振盪하였다. 이것을 거름종이(Toyo 거름종이 No.2)로 걸러 胞子懸濁液을 만들었다. 이 胞子懸濁液은 必要에 따라 稀釋하여 使用하였다(懸濁液中の 胞子數를 Thoma氏 血球計로 測定하여 胞子濃도가 1~10×10⁶cells/ml이 되게 함).

이 胞子懸濁液 10 ml를 지름 約 9 cm의 케트리접시에 取하고 15 W의 紫外線燈(Toshiba製)에서 10 cm의 거리에 놓고 30秒~2分 30秒間 照射하였다. 照射는 無菌室內에서 케트리접시의 뚜껑을 열고 자석것대(magnetic stirrer)로 저어주면서 하였다. 照射 後 處理液 0.05 ml를 Table 1에 表示한 平板培地(케트리접시에 固化시킨 培地)에 塗抹하였다. 이것을 30°C에서 3日間 培養한 後 콜로니(colony)의 形態와 澱粉分解環의 크기를 관찰하고 콜로니를 取하여 麥芽汁寒天斜面培地에 移植하였다.

한편 紫外線照射時의 胞子生存率은 胞子懸濁液 0.1 ml를 蒸溜水 10 ml에 稀釋하고 稀釋液 0.05 ml를 平板培地에 塗抹하여 培養한 後 콜로니數를 調査하고 또 紫外線照射區의 콜로니數를 調査하여 計算하였다.

Table 1. Composition of starch-peptone medium

Corn starch	30 g
Peptone	1 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
Agar-agar	25 g
Distilled water	100 ml

나. NTG處理

紫外線照射를 위한 경우와 같이 胞子懸濁液을 만들었다. 胞子懸濁液 5 ml에 NTG液(2 mg/tris buffer 1 ml) 0.1~0.5 ml를 加하여 混合하고 室溫에 50分間 放置하였다. NTG處理液 0.2 ml를 蒸溜水 10 ml에 稀釋하고(50倍稀釋) 이것에서 0.05 ml를 取하여 Table 1에 表示한 平板培地에 塗抹하였다. 以後의 處理는 紫外線照射의 경우와 같이 하였다.

培養方法

가. 밀기울麴

밀기울에 밀기울 무게와 同量의 水道水를 加하여 攪루 섞어주고 樽쳐서 잠시 放置한 다음 이것 10g(밀기울 5g에 해당하는 量)씩을 100 ml들이 삼각 플라스크에 넣고 綿栓한 後 15 psig에서 20分間 蒸煮殺菌하였다. 冷却後 寒天斜面培地에 培養한 試驗菌의 胞子 1白金耳씩을 接種하여 培養하였다.

나. 밀가루麴

밀가루에 밀기울 무게의 30%의 水道水를 加하여 攪루 섞어준 것 13g씩을 100 ml들이 三角 플라스크에 넣고 綿栓한 後 15 psig에서 20分間 蒸煮殺菌하였다. 冷却後 寒天斜面培地에 培養한 試驗菌胞子 1白金耳씩을 接種하여 培養하였다.

酵素活性的 測定

가, 글루코아밀라아제 活性

糖化酵素力은 A.U.(Amylolytic unit)^(11,12) 單位로 表示하고 糖定量은 hypoiodide法⁽¹³⁾으로 하였다. 中型 試驗管에 5% 可溶性 澱粉液 2 ml와 소요 pH의 McIlvaine buffer 2 ml를 取하고 이것을 40°C의 恒溫水槽中에 담가 約 5分間 豫熱한 다음 40°C에 保溫한 稀釋酵素液(밀기울麴은 20倍 抽出液을 2倍 稀釋한 液, 稀釋倍數는 必要에 따라 調整함) 1 ml를 피펫으로 불러 넣고 흔들어준다. 正確히 20分間 反應시킨 後 反應液 1 ml를 取하여 糖定量을 하였다. 바탕試驗(blank test)으로는 酵素液을 添加한 直後의 反應液 즉, 反應開始 前의 液 1 ml를 取하여 糖定量을 하였다.

酵素反應液의 糖量에서 바탕試驗液의 糖量을 뺀 값에 의하여 生成糖量을 求하고 40°C에서 10分間에 1mg의 글루코오스에 相當하는 糖을 生成하는 活性을 1 A.U.로 하여 麴 1g이 나타내는 力價로 表示하였다.

$$A. U. = \frac{\text{反應液 全量中の 生成糖量}(mg)}{\text{使用한 酵素液量}} \times \frac{1}{2} \\ \times \text{麴의 稀釋倍數}$$

윗 式에서 1/2을 곱한 것은 反應時間을 10分으로 規定한데 對하여 實際 反應時間은 20分間이기 때문이다.

나. α-아밀라아제 活性

不破⁽¹⁴⁾의 blue value法의 變法⁽¹⁵⁾에 依하였다. 즉, 試驗管에 1% 可溶性 澱粉(Merk 社製)液 1 ml와 所要 pH의 McIlvaine buffer 1 ml를 取하고 이것에 稀釋酵素液(麴의 20倍 抽出液을 20倍 稀釋한 液, 稀釋倍數는 必要에 따라 調整함) 0.5 ml를 加하여 흔들어주고 40°C에서 30分間 反應시킨 後 1N-CH₃COOH 5 ml를 加하여 反應을 停止시키고 이 중에서 0.5 ml를 取하 0.005% I₂액 5 ml를 넣어둔 試驗管에 넣어 發色시킨 後 660 nm에서 吸光度를 測定하였다. 酵素反應液의 吸光度에서 바탕試驗(酵素液 대신 증류수를 使用한 것)의 吸光度를 뺀 값에 麴의 稀釋倍數를 곱한 값으로 酵素力價를 表示하였다.

다. 단백질 가수분해효소의 活性

단백질 가수분해효소(protease)活性의 測定은 Anson 變法^(16,17)에 依하였다. 즉, 試驗管에 酵素液(麴의 20倍 抽出液을 그대로 使用, 必要에 따라 稀釋하여 使用함) 1 ml를 取하고 이것에 0.6%의 소요 pH의 카제인液 2.5 ml를 加하여 잘 흔들어주고 30°C에서 10分間 反應시켰다. 이어서 0.55 M TCA 2.5 ml를 加하여 反應을 中止시키고 30°C에서 30分間 放置하여 蛋白質이 完全히 沈澱되면 지름 約 3 cm의 깔대기를 使用하여 濾過하였다. 바탕試驗은 酵素液 0.5 ml를 取한 試驗管에 먼저 TCA溶液 2.5 ml를 加하고 이어서 카제인液을 添加하고 앞에서와 같이 處理한 後 濾過하였다. 各

거른액 1 ml씩을 試驗管에 取하여 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 ml씩을 加한 後 3倍 稀釋한 Folin 試藥 0.5 ml씩을 加하여 곧 흔들어주고 30°C에서 30分間 放置하여 發色시킨 後 660 nm의 光으로 吸光度를 測定하였다. 酵素反應液의 吸光度에서 各各의 바탕試驗의 吸光度를 뺀 값은 吸光度測定值로 하였다. 다음에 水溶液中的 tyrosine量과 吸光度測定值로부터 別途로 作成한 標準曲線에 依하여 측정한 吸光度로부터 反應液의 tyrosine量을 求하고, 酵素活性의 單位는 30°C, 1分間에 1 μg tyrosine에 相當하는 吸光度를 나타내는 酵素量을 1單位로 하고 麴 1g이 나타내는 活性으로 表示하였다.

0.6% 카제인液을 調製할 때 pH 6.0 以上の 경우는 0.05 M Na₂HPO₄ 100 ml에 우유 카제인 1.2 g을 加하여 加熱溶解시키고 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH로서 所要 pH로 調整한 後 同一 pH의 완충용액을 加하여 200 ml로 하였다. pH 5.0 以下の 경우는 0.05 M 鉻산 100 ml에 우유카제인 1.2 g을 加하여 加熱溶解시키고 以下 同一하게 하였다. 완충용액으로는 McIlvaine buffer와 Clark-Lubs buffer를 使用하였다.

酸生成力의 測定

麴을 20倍量의 蒸溜水로 抽出한 後 濾過한 거른액 10 ml를 取하고 pH미터(TOA社製)를 使用하여 0.1 N NaOH로 pH 7.0 될 때까지 滴定하고 그 滴定값으로 表示하였다. 밀가루麴의 경우는 10倍量의 蒸溜水로 抽出한 液을 使用하였으므로 滴定值의 1/2값으로 表示하였다.

結果 및 考察

選定한 *Asp. niger* 돌연變異菌株의 特徵

가. *Asp. niger*의 돌연變異菌株의 選定

*Asp. niger*를 돌연변이 유발원으로 처리한 후 分離한 菌株을 밀기울麴培地에 30°C에서 2日間 培養하여 글루코아밀라아제 活性 또는 酸生成力이 親株보다 明白히 강한 菌株을 變異株로 選定하였다. 그 결과 CF 菌株을 最初의 親株로 하고 이것에 紫外線照射處理를 하여 가장 우수한 CF-11 菌株을 選定하였고, 이 균주에 다시 NTG處理를 하여 CF-22 菌株과 CF-21 菌株을 分離하였다.

나. 돌연變異菌株의 形態

親株와 選定한 變異株를 밀기울麴培地에 培養하여 外觀의 特徵을 살펴보면 CF-21 菌株은 CF 및 CF-11에 比하여 生育과 孢子着生이 약간 늦었으며, CF-22 菌株은 孢子頭의 色이 淡黃褐色으로 變換한 것이 特徵이었다. 試驗菌株을 麥芽汁寒天培地에 培養하여 현미경으로 觀察한 結果는 Table 2와 같다. Table 2에서 보

Table 2. Microscopic phenotypes of *Aspergillus niger* mutants on malt agar

(Unit: μ)

Phenotypes		Mother strain	Mutants			
		CF	CF-11	CF-21	CF-22	
Conidia	diam.	2~4	2~5	2~4	2~4	
Conidial head	length	106~290	90~200	150~270	150~280	
Conidiophore	length	930~2200	1500~2500	1150~1700	1000~1800	
	width	13~20	13~20	10~15	8~20	
Visicle	diam.	55~71	40~80	40~50	30~70	
Primary sterigmata	length	35~65	8~21	13~20	18~50	
	width	13~16	4~6	7~10	3~6	

는 바와 같이 試驗菌株 사이에 크게 다른 것이 없으나 CF-11, CF-21 및 CF-22 菌株는 親株인 CF에 比하여 第1梗子의 길이가 짧고 幅이 좁았다.

作用 pH와 酵素活性

가. 글루코아밀라아제와 α -아밀라아제의 pH-活性曲線.

選定한 돌연變異菌株와 親株를 밀기울麴培地에서 30°C로 2日間 培養한 경우 글루코아밀라아제와 α -아밀라아제의 pH-活性曲線은 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다.

그림에서 보는 바와 같이 試驗한 菌株의 글루코아밀라아제는 모두 pH 4.0에서 最大活性을 보였으며 α -아밀라아제는 pH 4.0 附近에서 最大活性을 나타냈다.

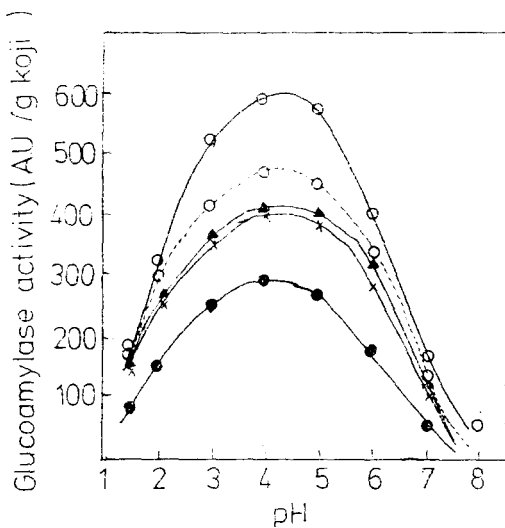


Fig. 1. Effect of pH on the glucoamylase activity

●—●, Strain CF; ○—○, Strain CF-22
 ▲—▲, Strain CF-11; ○—○, Strain B-11
 ×—×, Strain CF-21

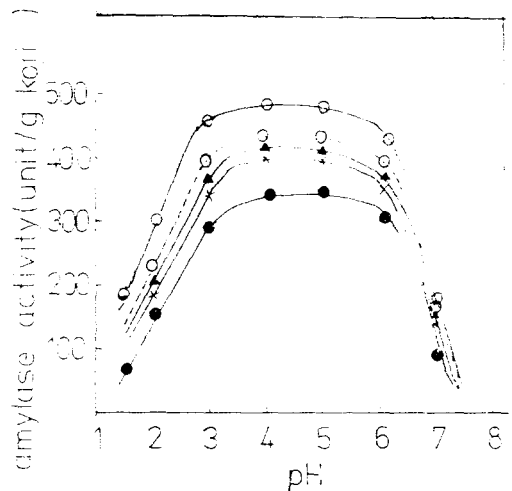


Fig. 2. Effect of pH on the α -amylase activity

●—●, Strain CF; ○—○, Strain CF-22
 ▲—▲, Strain CF-11; ○—○, Strain B-11
 ×—×, Strain CF-21

그러나 α -아밀라아제의 경우는 pH 3~6의 範圍에서는 pH에 依한 活性의 差가 크지 않았다. pH 活性曲線으로 보아 變異株와 親株는 同一性狀의 글루코아밀라아제와 α -아밀라아제를 生産하며 變異株의 酵素生産量이 많은 것은 酵素生産의 調節機構에 變化가 일어나서 多量의 酵素를 生産하게 된 것이라고 생각된다.

아밀라아제의 活性의 크기를 比較해 보면 CF-22 菌株의 글루코아밀라아제 活性은 最適條件에서 CF 菌株의 約 2倍, CF-11 菌株의 約 1.5倍였으며 對照菌株인 RI-B11보다는 25% 높았다. CF-22 菌株의 α -아밀라아제 活性은 最適條件에서 CF 菌株보다 約 50% 上昇되었다.

나. 단백질가수분해효소의 pH-活性曲線

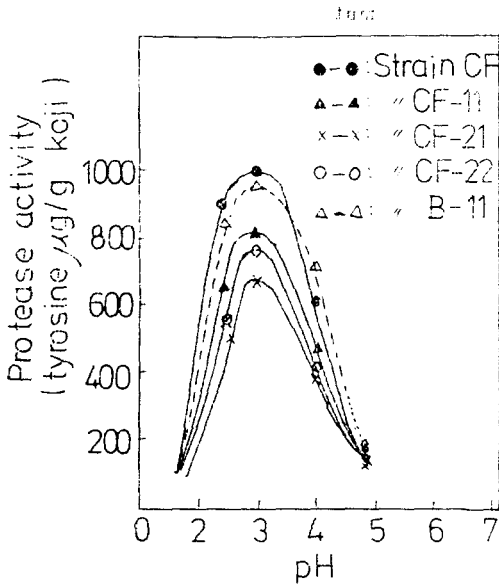


Fig. 3. Effect of pH on the protease activity

前記한 글루코아밀라아제의 경우와 同一한 條件에서 培養하여 protease의 pH-活性曲線을 作成한 바 그 結果는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3을 보면 試驗한 菌株의 단백질가수분해효소는 어느 것이나 pH 3에서 最大活性을 나타내었다. 그러나 글루코아밀라아제의 경우와 달리 變異株인 CF-22과 CF-21의 단백질 가수분해효소의 活性은 變異의 親株인 CF-11 및 CF 菌株보다 弱하였다. 即 變異株 CF-22과 CF-21는 親株에 比하여 아밀라아제 活性은 強化되었으나 단백질가수분해효소의 活性은 오히려 弱하였다.

Metzenberg⁽¹⁸⁾는 親株보다도 多量의 invertase와 trehalase를 生産하는 *Neurospora crassa*의 變異株를 分離하고 酵素의 生産量이 單一의 遺傳子의 變化에 依하여 影響을 받는다고 하였으며 Gratzner와 Sheehan⁽¹⁹⁾는 飢餓培養으로 아밀라아제와 invertase를 多量生産하는 *Neurospora*屬의 變異株를 分離하고 酵素生産量의 增加가 單一의 遺傳子의 變異에 依하는 것이라고 하였다. 그러나 本 試驗에서 얻은 變異株의 경우에는 아밀라아제 活性과 단백질 가수분해효의 活性이 同時에 強化되지 않았으며 이들 두 酵素가 單一遺傳子의 變化에 關係된다고 생각되지는 않는다.

酸生成力

試驗菌株를 밀기울麴培地에 接種하여 30°C에서 培養하면서 經時的으로 酸生成力을 測定한 結果는 Fig. 4와 같다.

試驗結果에 依하여 알 수 있는 바와같이 밀기울麴에

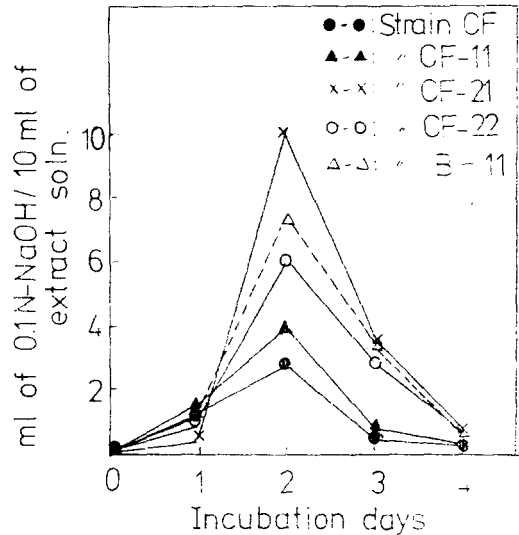


Fig. 4. Acid produced by selected strains on wheat bran Koji at 30°C

서는 30°C로 2日間 培養이 좋았으며 3日間 培養時에는 酸生成力이 急速히 弱해졌다. 30°C에서 2日間 培養時 CF-21 菌株의 酸生成力은 CF 菌株의 約 4倍, CF-11 菌株의 約 2.5倍로 強力하였으며 對照菌株인 RI-B11보다는 20% 以上 強化된 菌株였다.

CF-22 菌株에 依한 酵素生産 및 酸生成 條件 가. 酵素生産

CF-22 菌株을 밀기울麴培地에 接種하고 培養溫度를 달리하여 經時的으로 글루코아밀라아제, α-아밀라아제

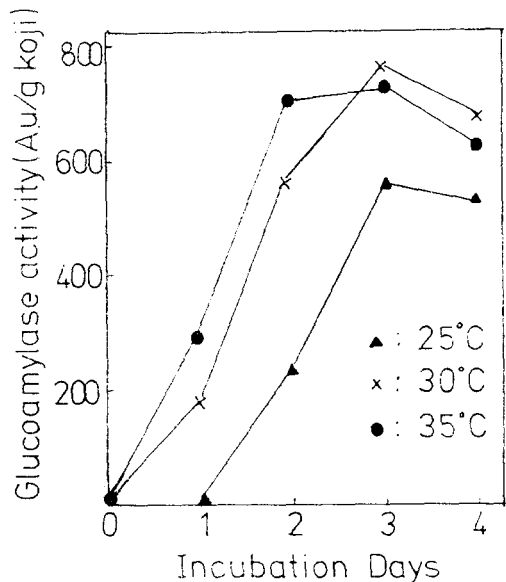


Fig. 5. Glucoamylase produced by strain CF-22 on wheat bran Koji

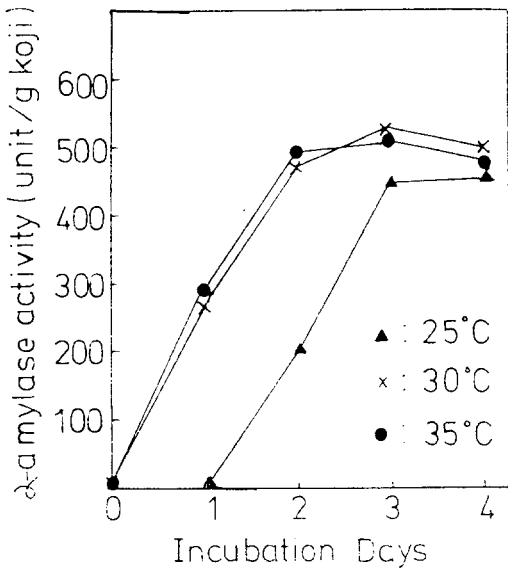


Fig. 6. α -amylase produced by strain CF-22 on wheat bran Koji

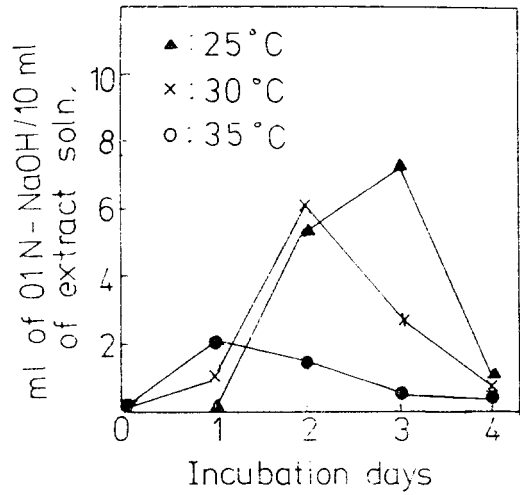


Fig. 8. Acid produced by strain CF-22 on wheat bran Koji

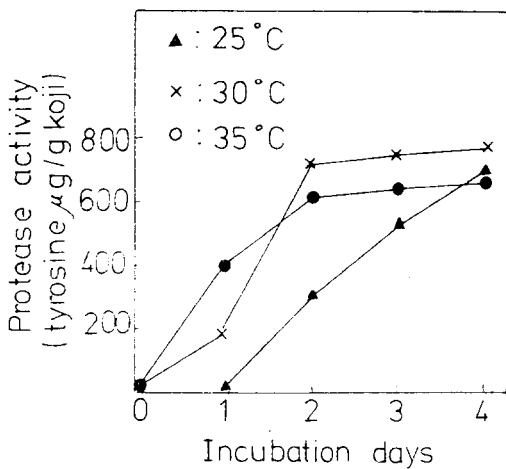


Fig. 7. Protease produced by strain CF-22 on wheat bran Koji

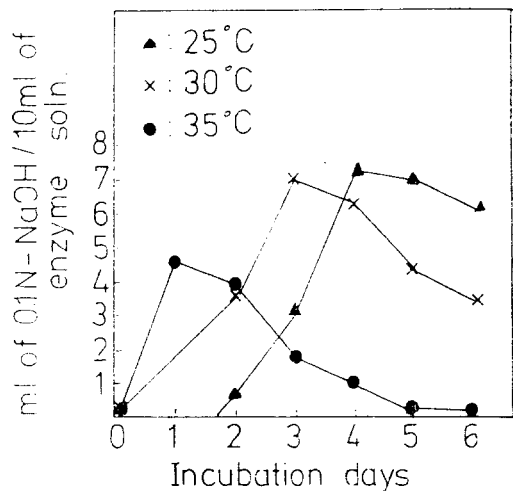


Fig. 9. Acid produced by strain CF-22 on wheat flour Koji

및 단백질 가수분해효소(pH 3.0에서)의 生産을 각각 檢討한 바 그 結果는 Fig.5~Fig. 7과 같다.

글루코아밀라아제 生産에 있어서는 30~35°C에서 培養하는 것이 좋았으며 35°C의 경우는 2日間, 30°C의 경우는 3日間 培養하는 것이 適當하였다. α -아밀라아제의 경우는 30~35°C에서 2日間 培養으로 目的을 이룰 수 있었다. 단백질 가수분해효소의 경우는 30~35°C에 培養하는 것이 좋으나 培養 4日後까지도 단백질 가수분해효소의 生成이 增加되었다. 25°C에서 培養하는 경우에는 初期生育이 떨어져졌으며 培養 1日에는

菌糸가 엉키지 않았다.

나. 酸生成

CF-22 菌株을 밀기울麴培地와 밀가루麴培地에 接種하고 培養溫度를 달리하여 經時的으로 酸生成力을 測定한 結果는 Fig. 8 및 Fig. 9와 같다.

Fig. 8을 보면 밀기울麴의 경우 培養溫度는 25~30°C가 適當하였으며 30°C 培養時는 2日間, 25°C 培養時는 3日間이 좋았다. 밀가루麴培地에 있어서는 Fig.9에 表示한 바와 같이 30°C에서는 3日間, 25°C에서는 4日間 培養했을 때 最高값을 나타내었다. 밀가루麴에서는 밀기울麴에서보다 菌의 生育이 늦어서 最高의 酸生成에 이르는 期間이 길었으며 最適條件에서의 酸生成量

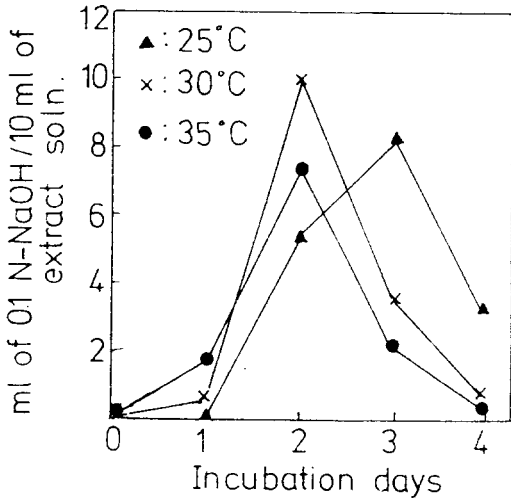


Fig. 10. Acid produced by strain CF-21 on wheat bran Koji

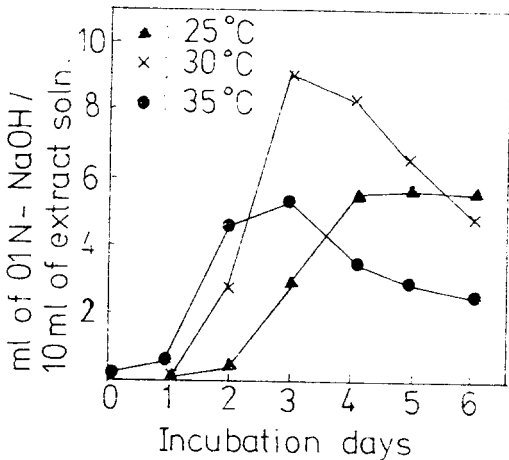


Fig. 11. Acid produced by strain CF-21 on wheat flour Koji

에는 차이가 별로 없었다.

CF-21에 의한 酸生成條件

CF-21 菌株의 酸生成力을 밀기울麴과 밀가루麴培地에서 測定한 結果는 각각 Fig.10 및 Fig.11과 같다. 밀기울麴에서는 30°C, 2日間 培養으로 最高값에 達하였으며 밀가루麴에서는 30°C, 3日間 培養時에 酸生成力이 가장 높았다. CF-21 菌株의 酸生成力도 最適條件에서는 CF-22 菌株 경우와 같이 밀기울麴과 밀가루麴 사이에 差가 別로 없었다.

要 約

Aspergillus niger CF를 最初의 親株로 하고 이것에

紫外線照射處理를 하여 돌연變異菌株 Asp. niger CF-11을 얻었으며 이어서 NTG 處理에 依하여 Asp. niger CF-11 菌株에서 變異菌株 Asp. niger CF-22 및 CF-21을 分離하였다. 變異菌株의 特徵을 調査하고 밀기울麴 및 밀가루麴에서의 酵素生産 및 酸生成을 檢討한 結果는 아래와 같다.

1. Asp. niger CF-22 變異菌株는 孢子頭의 色이 變換한 tan type의 菌株였으며 CF-22는 最初의 親株 CF에 比하여 밀기울麴培養의 最適條件에서 글루코아밀라아제活性이 約 2倍, α-아밀라아제活性은 約 50% 增加되었다.

2. Asp. niger CF-21 變異菌株는 孢子頭의 色은 變하지 않았으나 밀기울麴에서 生育과 孢子着生이 最初의 親株 CF보다 늦었다. 이 變異菌株의 酸生成力은 最初의 親株보다 約 4倍 많았다.

3. Asp. niger CF-22 變異菌株 및 CF-21 變異菌株는 最初의 親株보다 글루코아밀라아제 및 α-아밀라아제活性은 增強되었으나 澱粉질 가수분해효소의 活性은 오히려 떨어졌다.

4. 밀기울麴에서 Asp. niger CF-22 變異菌株의 글루코아밀라아제 生成의 最適條件은 30~35°C에서 2~3日間이었으며 α-아밀라아제의 경우는 30~35°C에서 2日間이었다.

5. Asp. niger CF-21 變異菌株의 酸生成力은 밀기울麴에서 30°C로 2日後에 最高에 達하였으며 밀가루麴에서는 30°C로 3日後에 最高값을 나타내었다. 最適條件에서의 酸生成力은 밀기울麴과 밀가루麴 사이에 差가 別로 없었다.

謝 意

本 研究는 文敎部 學術研究 助成費에 의하여 行爲된 것으로 當局에 깊은 謝意를 드리는 바이다.

文 獻

1. 中澤亮治, 霜三雄: 日本農化, 14, 895 (1938)
2. Zahi, P.A., Koller, L.R. and Haskins, C. P.: J. Gen. Physiol. 22, 689 (1939)
3. 堀井和男, 寺田直司, 渡邊大藏: 日本釀協誌, 8(3) 9 (1950)
4. Cardner, J.F., James, L.V. and Rubbo, S. O.: J. Gen. Microbiol., 14, 228 (1956)
5. 松島欽一, 嶋田協: 日本農化, 41, 671 (1967)
6. 飯塚廣, 山口長良: 日本農化, 25, 71 (1952), 28, 972 (1954)

7. 飯塚廣, 新井英夫: 日本農化, **35**, 1218 (1961)
8. 新井英夫, 今野憲二, 牧野正則: 日本醸協誌, **66**, 416(1971)
9. Alikhanian, S.I.: *Adv. in Microbiol.* ed. by umbert W.W., Academic Press, N.Y., Vol. 4, p.1 (1962)
10. 那須野精一, 小原忠彦, 井口信義: 日本調味科學, **19**(10), 27(1972)
11. 小卷利章: 日本澱粉工學誌, **7**, 3 (1959)
12. 朴允仲, 李錫健: 韓國農化誌, **9**, 91 (1968)
13. 山田正一: 醸造分析法, p. 112 (1956)
14. Fuwa: *J. Biochem. (Japan)*, **41**, 5 (1954)
15. 中倉健二, 畑中千歳: 日本醸協誌, **54**, 442 (1959)
16. Anson, M.L.: *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79 (1938)
17. 東京大學 農藝化學教室: 實驗農藝化學, 上卷, p. 281 (1976)
18. Metznerberg, R.L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 468(1962)
19. Gratzner, H. and Sheeham, D. N.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 686(1965)