

## *Pseudomonas synxantha* A3가 생산하는 세포외 Guanine Deaminase의 성질

전홍기 · 박정혜 · 이성태

부산대학교 자연과학대학 미생물학과  
(1986년 9월 1일 수리)

### The Properties of Extracellular Guanine Deaminase from *Pseudomonas synxantha* A3

Hong-Ki Jun, Jeong Hae Park and Sung-Tae Yee

Department of Microbiology, College of Natural Science,  
Pusan National University, Pusan, Korea  
(Received September 1, 1986)

Some properties of extracellular guanine deaminase produced by *Pseudomonas synxantha* A3 were studied. The enzyme was stable at pH 6.5-7.5 and generally stable when it was incubated at 40°C for 10 minutes but inactivated gradually above 40°C. When the enzyme in 0.2 M potassium phosphate (pH 8.0) was stored at room temperature, it was stable for thirty days. Alcohols and acetone were not effective for the enzyme stability. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were around pH 7.0-8.0 and 50°C, respectively. The enzyme was inhibited by 1 mM of Hg<sup>++</sup>, Ag<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> and by 0.1 mM of Ag<sup>+</sup> with about 50% loss of activity. The enzyme inhibited by Li<sup>+</sup> was reactivated by EDTA. 1 mM of pentachlorophenol and *p*-CMB inactivated the enzyme with 50% and 40% loss of activity, respectively. The enzyme inactivated by *p*-CMB was reactivated by glutathione.

Guanine deaminase (guanine aminohydrolase, EC 3.5.4.3)는 guanine이 xanthine과 ammonia로 분해되는 비가역적인 반응을 촉매하는 효소로서, 동물 조직내에서는 GTP 또는 allantoin에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>(1,2)</sup>. 또한 guanine deaminase는 purine의 salvage pathway에서 작용하는 효소인 IMP-GMP: pyrophosphate phosphoribosyltransferase 및 purine nucleoside phosphorylase와 guanine에 대하여 서로 경쟁하여 생체내 guanine nucleotide의 농도 조절에 관여한다<sup>(3,4)</sup>.

Guanine deaminase는 Schmidt<sup>(5)</sup>가 토끼의 간에서 발견한 이래 세균<sup>(6~11)</sup>, 효모<sup>(12)</sup>, 곤충<sup>(13,14)</sup>, 어류<sup>(15)</sup>, 포유류<sup>(16~20)</sup> 등에서 보고되어 있다. 또한 포유류내에서도 동물의 종류와 조직에 따라 효소의 활성에 차이가 큰 것으로 알려져 있다<sup>(19,20)</sup>.

사람의 경우에는 간, 뇌에서 guanine deaminase

의 활성이 높으며 특히 간이 손상되면 혈중의 guanine deaminase 활성이 증가되므로<sup>(20)</sup> 최근에는 이러한 성질을 이용하여 Ito등<sup>(21)</sup>이 간 기능 검사할 방법으로서 혈중의 guanine deaminase 활성 측정법을 개발한 바 있다.

현재 몇 가지 동물 기원의 guanine deaminase가 정제되어 있으나<sup>(3,22,23)</sup>, 효소적 특성과 대사조절기작등은 아직 불분명하다. 미생물 기원의 효소로는 *Clostridium acidurici*의 guanine deaminase<sup>(6)</sup>를 제외하면 세포내 효소의 존재여부만 확인되어 있을 뿐이다.

저자들은 adenine과 adenosine 내성균으로서 본 실험실에 보존중인 *Pseudomonas synxantha* A3<sup>(24)</sup>가 생산하는 세포외 guanine deaminase의 성질을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

Guanine과 xanthine은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japan) 제품을 사용하였으며, 그 외의 시약은 시판 특급품을 사용하였다.

### 사용균주

실험실의 보존균주 및 자연계에서 분리한 균주로부터 세포외 guanine deaminase 생산균을 검색한 결과, adenine과 adenosine 내성균으로서 분리된 *Pseudomonas synxantha* A3<sup>(24)</sup>를 실험균주로서 선정하였다.

### 배지 및 배양방법

효소생산을 위한 최적배지는 1% soluble starch, 0.5% peptone, 0.5% meat extract, 0.5% yeast extract, 0.3% NaCl (pH 8.0)를 사용하였다. 전배양은 상기배지 3ml 씩이 든 시험관(2.3×20.5cm)에 공시균 1백균이를 접종하여 12시간 배양하였다.

효소생산을 위하여 상기 배지 100ml가 든 500ml 용 진탕 플라스크에 전배양액 3ml를 접종하여 30℃에서 30시간 진탕배양한 배양액을 원심분리(10,000×g, 15분)하여 그 상등액을 모아 조효소액으로 사용하였다.

### 효소액

조효소액을 모아 황산암모늄을 40%까지 포화시켜 원심분리(10,000×g, 20분)한 후 그 상등액을 취하여 다시 황산암모늄을 가하여 80%로 포화시켰다. 원심분리(10,000×g, 20분)하여 생긴 침전물을 최소량의 0.01M tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 녹인 후 40배의 동일 완충액으로 4℃에서 충분히 투석하였다. 투석하여 얻은 효소액을 사용하여 여러 가지 효소학적 성질을 검토하였다.

### 효소의 활성측정

효소의 활성은 기질인 guanine과 생성물인 xanthine과의 흡광도 차를 이용한 Roush 등<sup>(14)</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응은 2 μmole의 guanine과 100 μmole의 tris-HCl 완충액(pH 8.0)과 적당량의 효소액이 든 1ml의 반응 system에서 행하였다. 기질을 제외한 반응액을 37℃의 항온조에서 10분간 예온시킨 후 기질을 첨가하고 37℃에서 30분간 반응을 진행시켰다. 0.5N NaOH, 3.9ml에 반응액 0.1ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 265nm에서 흡광도를 측정하였다. 265nm에서 guanine과 xanthine의 몰당 흡광도 차는 3.0 cm<sup>2</sup>/μmole이었다. 상기 표준반응 조건에서 1시간에 1 μmole의 xanthine을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 나타내었으며, 비활성은 단백질 1mg에 대한 효소의 활성으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 효소의 부분정제

조효소액에 황산 암모늄을 넣어 40~80%로 포화시킨 후 투석하여 얻은 효소액을 분실험에 사용하였다(Table 1).

### 효소의 온도 및 pH 안정성

0.2M의 tris 완충액(pH 8.0)에 일정량의 효소를 넣어 각 온도에서 10분간 처리한 후 급냉시켜 잔존 효소의 활성을 측정하였다. 실험결과 본 효소는 40℃까지는 안정하였으나 55℃ 이상에서는 급격히 실활되었으며, 65℃에서는 완전히 실활되었다(Fig. 1 A). 본 효소의 온도 안정성은, 65℃에서 10분만에 실활되는 rabbit liver<sup>(5)</sup>와 *Clostridium acidurici*<sup>(6)</sup> 기원의 효소와 비슷한 결과를 보였으며, 50℃에서 5분만에 실활되는 rat brain<sup>(25)</sup> 기원의 효소보다는 안정한 것으로 나타났다.

Table 1. Partial purification of enzyme.

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Broth	2533	1815	1.4	100
Ammonium sulfate (40-80%)	2400	221	10.9	95

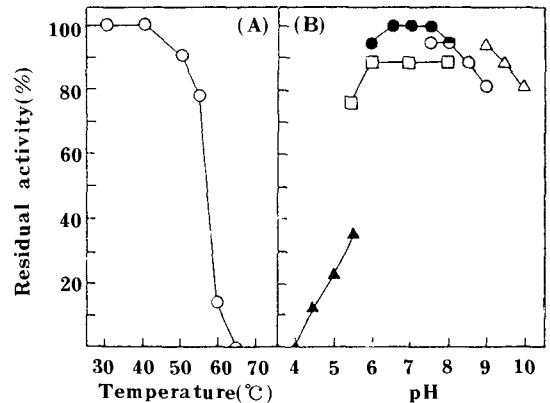


Fig. 1. Effect of temperature (A) and pH (B) on the enzyme stability.

(A) Enzyme solutions in 0.2M tris-HCl buffer, pH 8.0 were incubated at the indicated temperature for 10 minutes before the initiation of reaction.

(B) Enzyme solution in 0.2M buffer was treated at 55℃ for 10 minutes before the initiation of reaction. Buffer solutions used were sodium acetate buffer (▲), sodium phosphate buffer (□), tris-HCl buffer (○), potassium phosphate buffer (●), and glycine-NaOH buffer (△).

효소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 효소액을 0.05M의 각종 완충액으로 pH 4에서 pH 10까지 조절하여 55°C에서 10분간 유지한 후 급냉하여 잔존 효소 활성을 측정하였다.

Fig. 1의 B에서 보는 바와 같이 pH 6에서 pH 9 사이에서 80% 이상의 활성을 보존하였으며, 완충액으로서는 sodium phosphate 완충액보다 potassium phosphate 완충액이 효소의 안정성에 더욱 효과적인 것으로 나타났다.

**완충액의 영향**

pH 8.0의 여러 종류의 완충액(0.2M)에 효소액을 넣어 실온에서 보존하면서 효소의 안정성을 검토하였다(Table 2). Potassium phosphate 완충액에서 보존하였을 때에는 효소활성이 약간 활성화되어 30일까지 안정하였고 sodium phosphate 완충액에서는 30일 경과 후 75%의 활성을 유지하였다. Pig brain 기원의 효소는 0.1M phosphate 완충액(pH 7.5)과 함께 4°C에서 보관하였을 때 3달 동안 안정하였으며<sup>(22)</sup>, rat brain 기원의 효소는 10mM potassium phosphate 완충액(pH 7.0)과 함께 0°C에서 보관하였을 때 2주 이상 안정한 것으로 보고되어<sup>(23)</sup>, 실온에서 1달 이상 안정한 본 효소와 함께 대체로 안정한 효소로 인정되었다.

**Alcohol 및 acetone의 영향**

효소액을 15%의 각종 alcohol과 acetone에 넣어 실온에 보관하면서 효소의 잔존 활성을 측정하였다(Table 3). Sakai와 Jun<sup>(26)</sup>은 *Pseudomonas*의 adenosine deaminase가 15%의 alcohol에 안정하다고 하였으며, Gekko와 Timasheff<sup>(27)</sup>는 효소 단백질의 glycerol에 의한 안정화를 보고한 바 있다. 본 효소의 경우 n-propyl alcohol에 효소를 보관하였을 때는 3일만에, acetone에서는 15일만에, ethyl alcohol과 methyl alcohol에서는 30일만에 각각 완전히 실활되어 Sakai와 Jun<sup>(26)</sup>과 Gekko와 Timasheff<sup>(27)</sup>의 효소와는 달리 alcohol류에 의해 안정화

**Table 3. Effect of alcohols and acetone on the enzyme stability.**

Addition (15%)	Residual activity (%)		
	3 days	15 days	30 days
Acetone	43	0	0
Ethyl alcohol	79	29	0
Ethylene glycol	100	93	86
Glycerol	100	86	0
Methyl alcohol	86	86	71
n-Propyl alcohol	0	0	0
None	100	100	100

The enzyme solutions were placed at room temperature with 15% alcohol or acetone as indicated.

되지 않는 것으로 나타났다.

**효소활성에 대한 온도 및 pH의 영향**

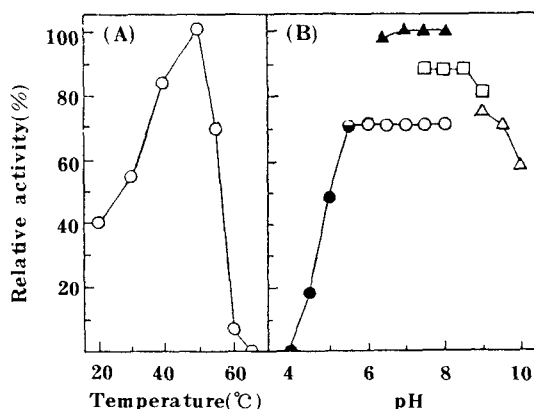
효소의 활성에 적합한 온도를 검토하기 위하여 반응 온도를 20°C에서 65°C까지 각각 변화시켜 활성을 측정하였다(Fig. 2, A). 반응온도에 따라 효소의 활성은 크게 차이를 보였으며 50°C 부근에서 효소 활성이 가장 크게 나타나 *Pseudomonas iodinum*의 세포내 효소인 adenosine deaminase<sup>(26)</sup>와 본 균주의 xanthine dehydrogenase<sup>(28)</sup> 최적 온도보다 다소 높은 온도에서 활성이 크게 나타났다.

본 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 4에서 10까지의 여러가지 완충액을 사용하여 효소의 활성을 측정하였다. Fig. 2의 B에

**Table 2. Effect of various buffers on the enzyme stability.**

Buffer	Residual activity (%)		
	3 days	15 days	30 days
Tris-HCl	100	100	88
Potassium phosphate	107	107	104
Sodium phosphate	100	93	75

Each buffer contains 0.2M concentration and pH adjusted to 8.0. After standing for indicated period at room temperature, residual activity was assayed by standard assay method.



**Fig. 2. Effect of temperature (A) and pH (B) on the enzyme activity.**

The enzyme activity was determined by standard assay method except that temperature and pH were changed. Buffer solutions used in (B) were sodium acetate (●), sodium phosphate (○), tris-HCl (□), potassium phosphate (▲), and glycine-NaOH (△). 0.2M of each buffer was used.

**Table 4. Effect of metal ions on the enzyme activity.**

Metal ion	Relative activity (%)	
	1 mM	0.1 mM
BaCl <sub>2</sub>	95	99
CaCl <sub>2</sub>	98	118
CoCl <sub>2</sub>	110	105
CrCl <sub>2</sub>	94	100
CuCl <sub>2</sub>	92	104
FeCl <sub>3</sub>	99	101
HgCl <sub>2</sub>	49	87
KCl	93	100
MgCl <sub>2</sub>	99	103
MnCl <sub>2</sub>	105	91
NaCl	98	107
NiCl <sub>2</sub>	106	100
SnCl <sub>2</sub>	102	105
ZnCl <sub>2</sub>	70	112
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11	50
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	45	92
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	88	104
None	100	100

Metal ions were added to the basal reaction mixture. After ten minutes at 37°C, the enzyme activity was measured as standard assay method.

서 보는바와 같이 효소 반응의 최적 pH는 7.0에서 8.0 부근이었으나 pH 6.0과 pH 9.0 부근에서도 80% 이상의 활성을 가져 대체로 넓은 pH 범위에서 높은 효소활성을 유지하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 rat brain 기원의 효소의 최적 pH가 pH 7.5에서 pH 9.0 사이<sup>(25)</sup> 이거나, pH 7.4에서 pH 9.4 사이<sup>(23)</sup> 인 점과 비슷하였으나 sheep brain<sup>(29)</sup> 과 lingcod muscle<sup>(15)</sup> 기원의 효소처럼 2 개의 peak를 나타내지는 않았다.

#### 효소활성에 미치는 금속이온의 영향

금속이온이 본 효소의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소반응 system에 각종 금속이온을 농도별로 첨가하여 효소의 활성을 측정하였다. Table 4에 나타낸 바와 같이 0.1mM과 1mM의 Ag<sup>+</sup>이 본 효소의 활성을 크게 저해하였으며 0.1mM의 Li<sup>+</sup>과 Hg<sup>++</sup>도 본 효소의 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 0.1mM의 Ca<sup>++</sup>과 1mM의 Co<sup>++</sup>이 본 효소의 활성을 약간 증가시키는 것으로 나타났으나 그 외의 금속이온들은 본 효소의 활성에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. Kumar 등<sup>(25)</sup>이 보고한 rat brain의 효소는 Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>에 의해 저

해되었고, 역시 Kumar가 1973년에 보고한 rat liver의 효소는<sup>(2)</sup> 1mM의 Mg<sup>++</sup>에 의해 활성화되어 본 효소의 성질과는 차이를 나타내었으나, lingcod muscle의 효소<sup>(15)</sup>는 0.1mM의 Cu<sup>++</sup>에 의해 별다른 영향을 받지 않으며, mouse liver의 효소<sup>(17)</sup>는 Ca<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>등에 의해 영향을 받지 않는 것으로 보고되어 본 효소의 성질과 비슷한 결과를 보였다.

다음으로 금속이온에 의해 저해된 본 효소에 착염 형성 시약인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 처리하여 효소의 활성화 유무를 확인 하였으나(Table 5). 0.2M tris-HCl 완충액에 본 효소와 1mM의 AgNO<sub>3</sub>, Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 각각 첨가하여 37°C에서 10분간 처리한 후 잔존 효소의 활성을 측정하였다. 그 결과 Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>++</sup>에 의해 저해된 효소의 활성은 EDTA에 의해 미약하게 회복되었고, Li<sup>+</sup>에 의해 저해된 본 효소의 활성은 EDTA에 의해 거의 완전히 회복되었다.

#### 각종 저해제 및 thiol compound의 영향

일반적인 효소 저해제를 사용하여 본 효소에 대한 저해효과를 검토하였다(Table 6). 1mM 농도에서 trichloroacetate는 약 30%, p-chloromercuribenzoic acid(p-CMB)는 약 40%, pentachlorophenol은 50% 정도 본 효소의 활성을 저해하였고 사용된 다른 저해제들은 대부분 20% 정도 본 효소의 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 0.1mM에서는 p-CMB와 pentachlorophenol이 본 효소의 활성을 20% 정

**Table 5. Effect of EDTA\* on the enzyme inhibited by metal ions.**

First incubation (1 mM)	Second incubation	Residual activity (%)
None	None	100
None	EDTA 1 mM	107
AgNO <sub>3</sub>	None	17
AgNO <sub>3</sub>	EDTA 1 mM	29
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	None	16
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	EDTA 1 mM	18
HgCl <sub>2</sub>	None	7
HgCl <sub>2</sub>	EDTA 1 mM	22
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	None	79
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	EDTA 1 mM	106

The enzyme solutions were incubated at 37°C for 10 minutes with metal ions. After then EDTA was added to the enzyme solution and incubated for further 10 minutes. The residual activity was assayed by standard method.

\*EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

Table 6. Effect of some reagents on the enzyme activity.

Reagent	Relative activity (%)	
	1 mM	0.1 mM
$\alpha, \alpha'$ -Dipyridyl	79	111
EDTA	80	101
Monoiodoacetate	82	93
NaCN	81	98
NaF	83	99
NaN <sub>3</sub>	83	93
N-Ethylmaleimide	82	95
O-Phenanthroline	92	101
p-Chloromercuribenzoic acid	62	81
Pentachlorophenol	51	80
Trichloroacetate	70	94
Cysteine	90	93
Glutathione	86	92
2-Mercaptoethanol	95	97
None	100	100

The reagents were added to the basal reaction mixtures. The reaction mixtures were preincubated at 37°C for 10 minutes before the reaction.

도 저해하였다. 본 효소의 p-CMB에 의한 저해는 mouse liver 기원의 효소<sup>(17)</sup>와 비슷한 결과를 보였으나 0.1 mM의 p-CMB에 의해 80% 이상 저해되는 rabbit liver 기원의 효소<sup>(30)</sup>에 비해 그 저해도는 낮았다.

또한 효소의 안정화에 이용되기도 하는 cysteine, glutathione, 2-mercaptoethanol 등의 thiol compound의 영향을 살펴본 결과 본 효소에 대하여 약간의 저해현상을 나타내어 (Table 6), 2-mercaptoethanol에 의해 활성화되는 rat liver 기원의 효소<sup>(17)</sup>와는 다른 성질을 가지는 것으로 생각되었다.

다음으로 p-CMB에 의해 저해된 본 효소에 thiol compound를 가하여 효소의 활성을 측정할 결과 (Table 7), glutathione이 p-CMB에 의해 저해된 본 효소의 활성 회복에 효과를 나타내었으며, 2-mercaptoethanol도 약간의 활성회복 효과를 나타내었다. p-CMB에 의해 저해된 효소의 thiol compound에 의한 활성회복은 Jun과 Sakai<sup>(31)</sup>에 의한 보고에서와 같이 효소의 활성부위의 hydrophilic site에 thiol group이 관여하기 때문인 것으로 생각되어 설 수 있다.

Table 7. Effect of thiol compounds on the enzyme treated with p-CMB\*.

First incubation (1 mM)	Second incubation	Relative activity (%)
None	None	100
p-CMB	None	75
"	Cysteine	79
"	2-Mercaptoethanol	83
"	Glutathione	93

The reaction conditions are the same as those in Table 5.

\*p-CMB, p-chloromercuribenzoic acid.

요 약

*Pseudomonas synxantha* A3가 생산하는 세포외 guanine deaminase의 몇가지 성질을 검토하였다. 본 효소의 안정 pH는 6.5~7.5 부근이었으며, 열안정성을 검토하기 위하여 각 온도에서 10분간 처리하였을 때 40°C 까지 안정하였고 그 이상의 온도에서는 서서히 실활되었다. 또한 pH 8.0의 0.2M potassium phosphate 완충액에 본 효소를 보관하였을 때 실온에서 30일간 안정하였고 alcohol 및 acetone은 본 효소의 안정화에 효과가 없었다. 효소활성을 위한 최적온도 및 pH는 각각 50°C와 pH 7~8 부근이었다. 본 효소는 1 mM의 Hg<sup>++</sup>, Ag<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>에 의해 각각 50% 이상 저해되었으며, 0.1 mM의 Ag<sup>+</sup>에 의해서도 50% 이상 저해되었다. Li<sup>+</sup>에 의해 저해된 본 효소에 EDTA를 가하였을 때 효소의 활성회복에 효과가 있었다. 본 효소의 활성은 1 mM의 pentachlorophenol에 의해 50%, p-CMB에 의해 40% 정도 저해되었다. p-CMB에 의해 저해된 본 효소에 thiol compound를 가하였을 때에는, 사용된 시약 중 glutathione이 본 효소의 활성회복에 효과적인 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Kumar, K.S. and P.S. Krishnan: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 1087 (1970).
2. Kumar, K.S., A. Sitaramayya and P.S. Krishnan: *Biochem. J.*, **131**, 683 (1973).
3. Bergstrom, J.D. and A.L. Bieber: *Prep. Biochem.*, **8**, 275

- (1979).
4. Josan, V. and P.S. Krishnan: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 299 (1968).
  5. Schmidt, G.: *Z. Physiol. Chem.*, **208**, 185 (1932).
  6. Rakosky, J. Jr., L.N. Zimmerman and J.V. Beck: *J. Bacteriol.*, **69**, 566 (1955).
  7. Franke, W. and G.E. Hahn: *Z. Physiol. Chem.*, **301**, 90 (1955).
  8. Sakai, T., T. Watanabe and I. Chibata: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 488 (1971).
  9. Sin, I.L.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **110**, 12 (1975).
  10. Bongerts, G.P.A., I.L. Sin, A.L.J. Peters and G.D. Vogels: *Biochem. Acta*, **499**, 111 (1977).
  11. Canale-parola, E. and G.W. Kidder: *J. Bacteriol.*, **152**, 1105 (1982).
  12. Roush, A. and E.R. Norris: *Arch. Biochem. Biophys.*, **29**, 124 (1950).
  13. Pierre, L.: *Nature*, **208**, 666 (1965).
  14. Hodge, L.D. and E. Glassman: *Genetics*, **57**, 571 (1967).
  15. Roy, J.E.: *Canad. J. Biochem.*, **44**, 1093 (1966).
  16. Kumar, S., K.K. Tewari and P.S. Krishnan: *Biochem. J.*, **95**, 797 (1965).
  17. Kumar, K.S., A. Sitaramayya and P.S. Krishnan: *Biochem. J.*, **128**, 1079 (1972).
  18. Currie, R., F. Begel and R.C. Bray: *Biochem. J.*, **104**, 634 (1967).
  19. Levine, R., T.C. Hall and C.A. Harris: *Cancer*, **16**, 269 (1963).
  20. Knight, E.M., J.L. Whitehouse, A.C. Hue and C.V. Santos: *J. Lab. Med.*, **65**, 355 (1965).
  21. Ito, S.: *肝胆胆酸*, **11**, 448 (1985).
  22. Rossi, C.A., G. Hakim and G. Solaini: *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 235 (1978).
  23. Miyamoto, S., H. Ogawa, H. Shiraki and H. Makagawa: *J. Biochem.*, **91**, 167 (1982).
  24. Sakai, T. and H.-K. Jun: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 257 (1978).
  25. Kumar, S., V. Josan, K.C.S. Sanger, K.K. Tewri and P.S. Krishnan: *Biochem. J.*, **102**, 691 (1967).
  26. Sakai, T. and H.-K. Jun: *FEBS Letter*, **86**, 174 (1978).
  27. Gekko, K. and S.N. Timasheff: *Biochemistry*, **20**, 4677 (1981).
  28. Sakai, T. and H.-K. Jun: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 753 (1979).
  29. Mansoor, M., G.D. Kalyankar and G.P. Talwar: *Biochem. Biophys. Acta*, **77**, 307 (1963).
  30. Lewis, A.S. and M.D. Glantz: *J. Biol. Chem.*, **249**, 3862 (1974).
  31. Jun, H.-K. and T. Sakai: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 294 (1979).