Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 22, No. 6, 665-671 (1994)

Erwinia sp.에 의한 Gallic Acid로부터 Pyrogallol의 생산

박병화 · 황인균 · 방원기*
고려대학교 농화학과

Production of Pyrogallol from Gallic Acid by *Erwinia* sp.

Park, Byung-Hwa, In-Gyun Hwang and Won-Gi Bang*
Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — For the production of pyrogallol from gallic acid, about 100 strains of bacteria capable of assimilating gallic acid as a sole carbon and energy source were isolated from the soil. JH-004 strain showing the highest activity of gallate decarboxylase was selected from them and identified as *Erwinia* sp. The optimal conditions for the production of pyrogallol from gallic acid were examined. The resting cells of JH-004 cultured in a complex medium containing 0.2%(w/v) gallic acid were prepared after the treatment of the pellet with a freezing and thawing, and used as a enzyme source. The reaction mixtures for the maximal production of pyrogallol were shown to be 6 g/*l* of resting cells and 15 g/*l* of gallic acid in 25 mM potassium phosphate buffer. The optimal pH for the reaction was 5.0 and the optimal temperature was 35℃. Additionally, Triton X-100(0.01%, w/v) was found to be most effective for the production of pyrogallol. Under the above conditions, 10.27 g/*l* of pyrogallol was produced from 15 g/*l* of gallic acid after incubation of 35 hrs. This amount of pyrogallol corresponds to a 92.37% yields, based on gallic acid.

Pyrogallol은 흰색의 바늘 모양의 결정구조를 지니는 polyphenol계 화합물로서 공기나 알칼리성 용액 중에서 쉽게 산화되기 때문에 환원제로서 사용되며, Sb, Bi 등의 분석, 금, 은, 수은 등의 정량시의 환원제 등으로 사용된다. 또한 산업적으로는 사진 현상, 조각인쇄, 석판 인쇄에 많이 사용되며, 양모 등의 착색제, 가죽 및 모피의 염색제, 페인트의 광택제, 가솔린의 환원제 등으로 사용된다. 의학적으로는 피부질환 치료용 연고제, 머리 염색제 등에 사용된다(1-4).

Pyrogallol은 화학적으로는 자연계의 tannin 형태로 나뭇잎이나 나무껍질 등에 존재하는 gallic acid를 12기압 175℃로 autoclave 하여 탈탄소화시킨 후, charcoal로 탈색시키고 증류함으로서 생산된다(1). 생물학적으로는 1958년에 *Penicillium patulum*에 의해 pyrogallol이 생성된다고 처음 보고되었으며(5), 1959년에는 gallotannin이 *Penicillium* sp.의 tannase에 의해 gallic acid로 전환되고, 이 gallic acid는 동균주의 gallate decarboxylase (EC 4.1.1.59)에 의해 pyrogallol로 전환된다고 보고되어 있다(6). 이후 gallate decarboxylase의 활성은 *Aspergillus niger*를 비롯한 *Aspergillus* 속 및 *Penicillium* 속 등의 곰팡이에 존재한다고 보고되었고(7-10), 1982년에 토양으로부터 gallotannin을 이용하는 균주 *Citrobacter* sp. 64-1가 분리되어 gallic acid로부터 6.05 g/*l*의 pyrogallol이 생산되었다는 보고 이후, 통성 혐기성 미생물인 *Klebsiella* 속, *Erwinia* 속 및 *Aeromonas* 속 등의 세균에서도 그 활성이 보고되었으며, 동시에 gallic acid로부터 pyrogallol의 생산에 대한 연구가 활발히 진행되었다(11-15).

본 연구에서는 gallic acid로부터 pyrogallol을 생산하기 위하여 토양으로부터 gallic acid를 유일한 탄소원 및 에너지원으로서 이용할 수 있는 세균을 선별, 분리한 후 분리 균주의 균체를 효소원으로 이용하여 gallic acid로부터 pyrogallol을 생산하기 위한 최적 조건을 검토하였다.

Key words: Pyrogallol, gallic acid, *Erwinia* sp.
*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서는 경상남도 창원시 소재의 하천토양으로부터 gallic acid 자화성 균주 *Erwinia* sp.를 분리, 선별하여 사용하였다.

사용배지

분리용 배지로는 gallic acid 3 g/*l*를 함유하는 최소배지를 사용하였으며, gallic acid는 따로 멸균하여 첨가하였다. 또한 분리 균주의 전배양 및 본배양 배지로는 Yoshida 등(11)이 사용한 gallic acid 2 g/*l*를 함유하는 완전배지를 사용하였다.

균주의 분리 및 선별

토양으로부터 gallic acid 자화능을 지니는 세균을 분리하기 위하여 유일한 탄소원 및 에너지원으로서 0.3%(w/v) gallic acid를 함유하는 분리 배지에 토양 현탁액을 가하고 28℃ 에서 진탕배양(120 strokes/min, 2 cm)으로 2회 enrichment culture를 수행한 후 streak-plate 법으로 gallic acid 자화성 균주를 순수 분리하였다.

Gallate decarboxylase의 활성이 우수한 균주를 선별하기 위하여 상기의 최소배지를 10 m*l* 씩 함유하는 50 m*l* 삼각플라스크에 각각 분리 균주를 한 백금이 접종하여 28℃ 에서 24시간 진탕배양하였으며, 전배양액 2 m*l*를 최소배지 200 m*l* 씩 함유하는 500 m*l* 삼각플라스크에 접종하여 28℃ 에서 24시간 진탕배양하였다. 배양 균체는 수확한 후, 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.0)에 현탁한 다음 sonicator (Sch- oellerschall사)로 4℃ 에서 균체를 파쇄(8 KHz, 2분간)하고 원심분리(16,000×g, 20 min)하여 조효소액을 얻었으며, 조효소액내의 gallate decarboxylase의 활성을 측정하여 활성이 가장 우수한 균주를 선별하였다.

균주의 배양

선별된 균주는 한천평판배지로부터 한 군락을 백금이로 취하여 전배양 배지 10 m*l*를 함유하는 50 m*l* 삼각플라스크에 접종하여 28℃ 에서 24시간 진탕배양한 후, 동일한 조성의 본배양 배지 100 m*l*을 함유하는 500 m*l* 삼각플라스크에 접종하여 21시간 진탕배양하였다. 이렇게 배양한 균체를 수확하여 gallic acid로부터 pyrogallol 생산의 효소원으로 사용하였다.

휴지세포에 의한 전환 반응

Gallic acid로부터 pyrogallol로의 전환반응은 5 g/*l*의 gallic acid, 1 mM ascorbic acid 및 효소원으로서 균체를 함유하는 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0)의 반응 혼합액 50 m*l*를 50 m*l* 용 삼각플라스크에 넣고 28℃ 에서 진탕하면서 반응시켰다.

분석방법

Pyrogallol의 정성분석은 Pastuska(16)의 방법에 따라 thin layer chromatography로 수행하였다.

Pyrogallol의 정량 및 gallate decarboxylase의 활성 측정은 Grant와 Patel의 방법(17)에 따라 수행하였다. Pyrogallol의 양은 시료 1 m*l*에 1%(w/v)의 vanillin이 함유된 70%(v/v) 황산 2 m*l*를 가하여 18분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. Gallate decarboxylase의 활성 1 unit는 1분당 gallic acid로부터 1 μmole의 pyrogallol을 생성하는 것으로 정의하였으며, 비활성은 unit를 mg 단백질로 나눈 것으로 정의하였다.

단백질의 양은 표준물질로 bovine serum albumin (Sigma사)을 이용하여 Lowry 등(18)의 방법에 따라 750 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

균체의 생육은 분광광도계를 사용하여 610 nm에서 배양액의 혼탁도(optical density, O.D.)를 측정하여 구하였다.

균주의 동정

분리 및 선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(19)에 의거하여 수행하였다.

결과 및 고찰

Gallate decarboxylase의 활성을 지닌 균주의 분리 및 비활성이 높은 균주의 선별

Gallic acid로부터 pyrogallol로의 탈탄산반응을 촉매하는 gallate decarboxylase의 활성을 지닌 균주들

Table 1. Comparison of growth and specific activity of gallate decarboxylase of isolated microorganisms

Strain	Growth (O.D., 610 nm)	Specific activity of gallate decarboxylase (U/mg)
JH 002	3.03	0.673
JH 004	3.64	1.009
JH 013	2.50	0.205
JH 025	3.50	0.702
JH 026	3.17	0.201
JH 044	2.25	0.085
JH 062	2.80	0.505
JH 095	2.37	0.182

*Cultivations were carried out at 28℃ for 24 hrs in the medium containing 3 g/*l* gallic acid, 3 g/*l* Na_2HPO_4, 3 g/*l* KH_2PO_4, 1 g/*l* NH_4Cl, 0.5 g/*l* NaCl, 0.011 g/*l* $CaCl_2$ and 0.05 g/*l* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

을 재료 및 방법에 따라 100여종의 균주들을 분리하였으며, 그중 gallate decarboxylase 활성이 우수한 균주 8종을 일차 선별하였다. Table 1에서 볼 수 있듯이 일차 선별된 8종중에서 JH-004가 다른 균주에 비하여 생육 및 gallate decarboxylase의 비활성이 가장 좋았다.

분리 균주의 동정

순수 분리한 JH-004는 Gram 음성의 극성 편모를 가진 간균으로, 생리학적 및 생화학적 성질을 조사한 결과 Table 2와 같았으며, Bergey' Manual of Systematic Bacteriology에 의해 *Erwinia* sp.로 부분 동정하였다.

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain JH-004

Characteristics	JH-004
Morphological characteristics	
Motility	+
Shape	rod
Gram test	−
Assimilation of carbon compounds	
D-glucose	+
D-mannose	+
D-gluconate	−
L-arabinose	−
D-fructose	+
L-sorbose	−
D-xylose	+
maltose	+
D-melizitose	+
L-rhamnose	−
lactose	+
sucrose	+
succinate	+
citrate	+
D-gluconate	+
acetate	+
Physiological characteristics	
Oxidase	−
Catalase	+
Oxygen requirement	facultative anaerobe
O/F test	fermentative
Reduction of nitrates to nitrites	+
Methyl red test	−
Starch hydrolysis	−
Gelatin hydrolysis	−

*Symbols: +, positive; −, negative

증식세포의 생육 및 gallate decarboxylase 활성의 경시적 변화

Gallate decarboxylase의 활성이 높은 균체를 다량으로 수확하기 위하여 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 0.2%(w/v) gallic acid가 함유된 완전배지 상에서 시간의 경과에 따른 균체의 생육 및 gallate decarboxylase 비활성의 변화를 조사하였다. Fig. 1에서와 같이 균체의 생육은 12시간 후에 정지기에 이르렀으며, gallate decarboxylase 활성은 배양 초기부터 유도되기 시작하여 정지기 말기에 이르러 최대치에 도달하였으며, 이후에는 점차 감소하기 시작하였다. 따라서 이후의 실험에서는 gallate decarboxylase의 비활성이 최대인 20시간 배양 후에 균체를 수확하여 효소원으로서 사용하였다.

휴지세포에 의한 gallic acid로부터 pyrogallol의 생산

본 실험에서는 상기와 같이 수확한 *Erwinia* sp. JH-004의 균체를 gallate decarboxylase의 효소원으로서 이용, gallic acid로부터 pyrogallol을 생산하기 위한 반응의 최적 조건을 검토하였다.

세포처리가 pyrogallol의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수확된 균체를 Table 3과 같이 30분간 처리하여 실험을 수행하였으며(20, 21), 그 결과 수확

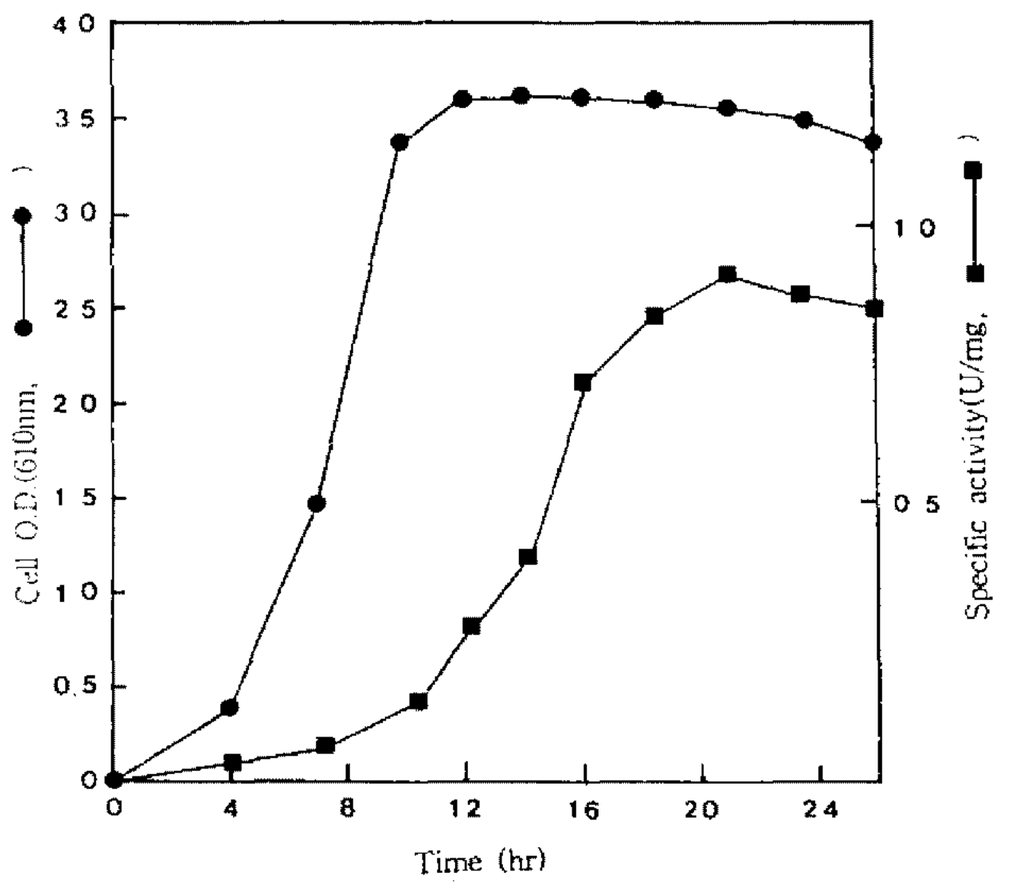

Fig. 1. Growth curve of *Erwinia* sp. JH-004 and change in gallate decarboxylase activity.
Cultivation of *Erwinia* sp. JH-004 was carried out at 28℃ in the medium containing 2 g/*l* gallic acid, 5 g/*l* peptone, 5 g/*l* meat extract, 2 g/*l* NaCl, and 5 g/*l* yeast extract.

Table 3. Effect of cell treatment on pyrogallol production

Cell treatment	Pyrogallol (g/*l*)
Whole cell	0.36
Frozen cell	0.48
5% Xylene	0
5% Toluene	0
5% Acetone	0.12
5% Benzene	0

*Reaction was carried out at 28℃ for 6 hrs in reaction mixture containing 4 g/*l* cell concentration, 5 g/*l* gallic acid, 1 mM ascorbic acid, and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0).

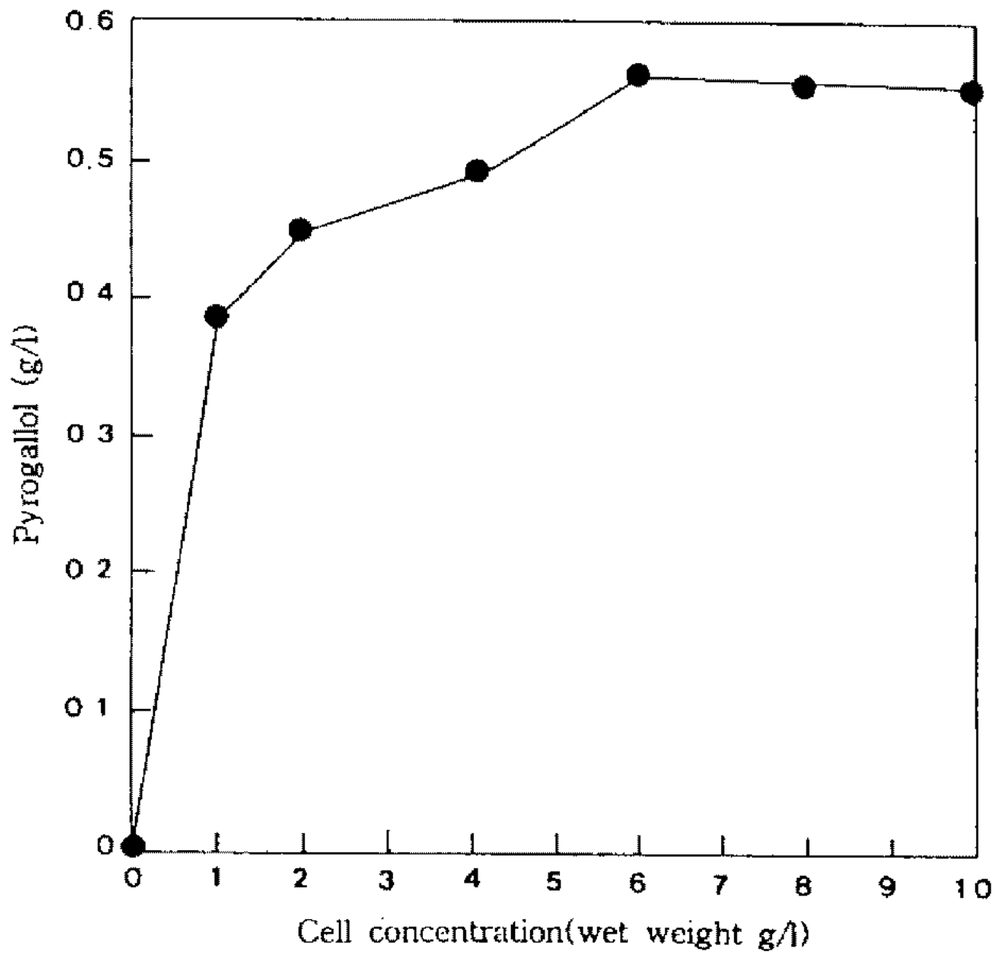

Fig. 2. Effect of cell concentration on pyrogallol production with resting cells.
Reaction was carried out at 28℃ for 6 hrs in reaction mixture containing 5 g/*l* gallic acid, 1 mM ascorbic acid, and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0).

된 균체를 −70℃에서 1회 얼렸다 녹여 사용하였을 때 대조구보다 33% 많은 양의 pyrogallol을 생산하였다.

효소원으로서 사용되는 생균체량의 변화에 따른 pyrogallol 생산량과의 관계를 검토한 결과 Fig. 2와 같이 균체량이 6 g/*l*에 이를 때까지 균체량이 증가함에 따라 pyrogallol 생산량도 증가하였으나 그 이상에서는 pyrogallol의 생산량은 더 이상 증가하지 않았다.

휴지세포에 의한 pyrogallol 생산시 기질인 gallic acid의 농도가 pyrogallol 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 3과 같이 gallic acid의 양이 15 g/*l*에 이르렀을 때 pyrogallol의 생산량은 0.74 g/*l*로 최대였으며, 그 이상의 gallic acid 농도에서는 기질에 의한

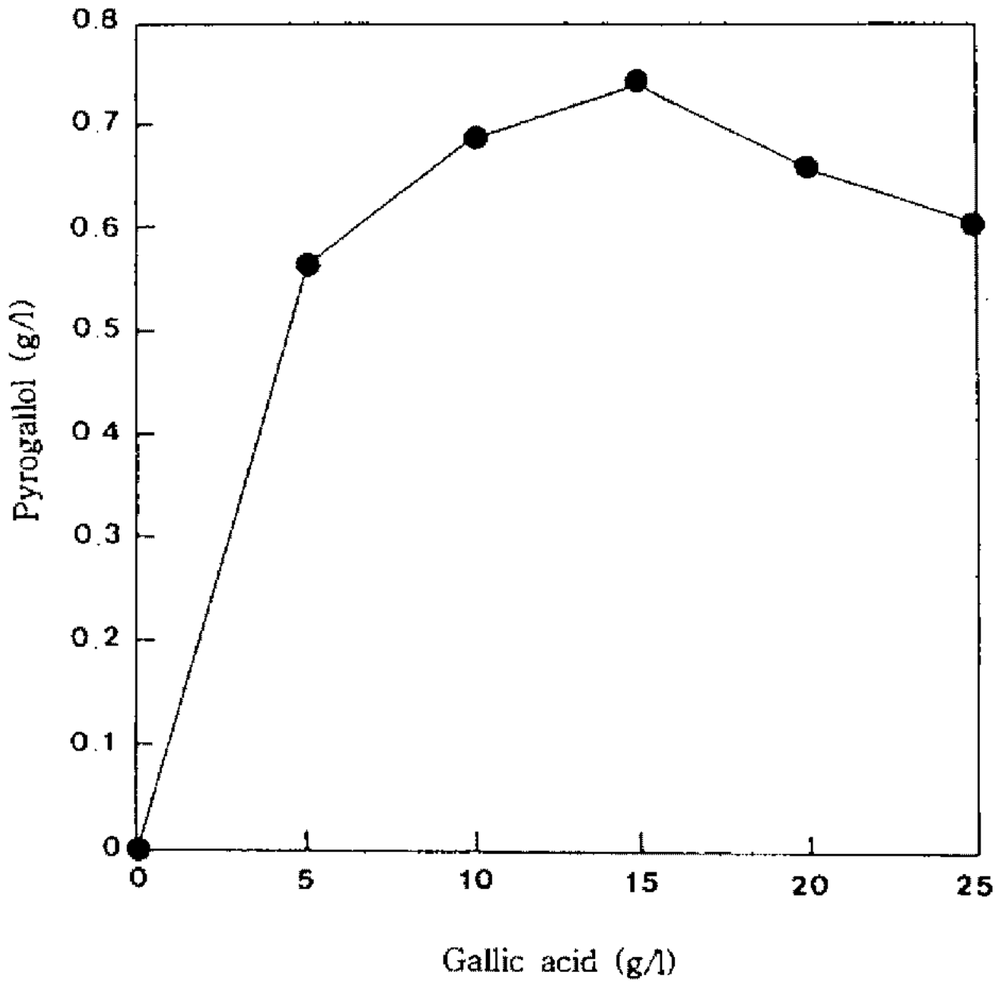

Fig. 3. Effect of gallic acid concentration on pyrogallol production with resting cells.
Reaction was carried out at 28℃ for 6 hrs in reaction mixture containing 6 g/*l* (wet weight) cell concentration, 1 mM ascorbic acid, and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0).

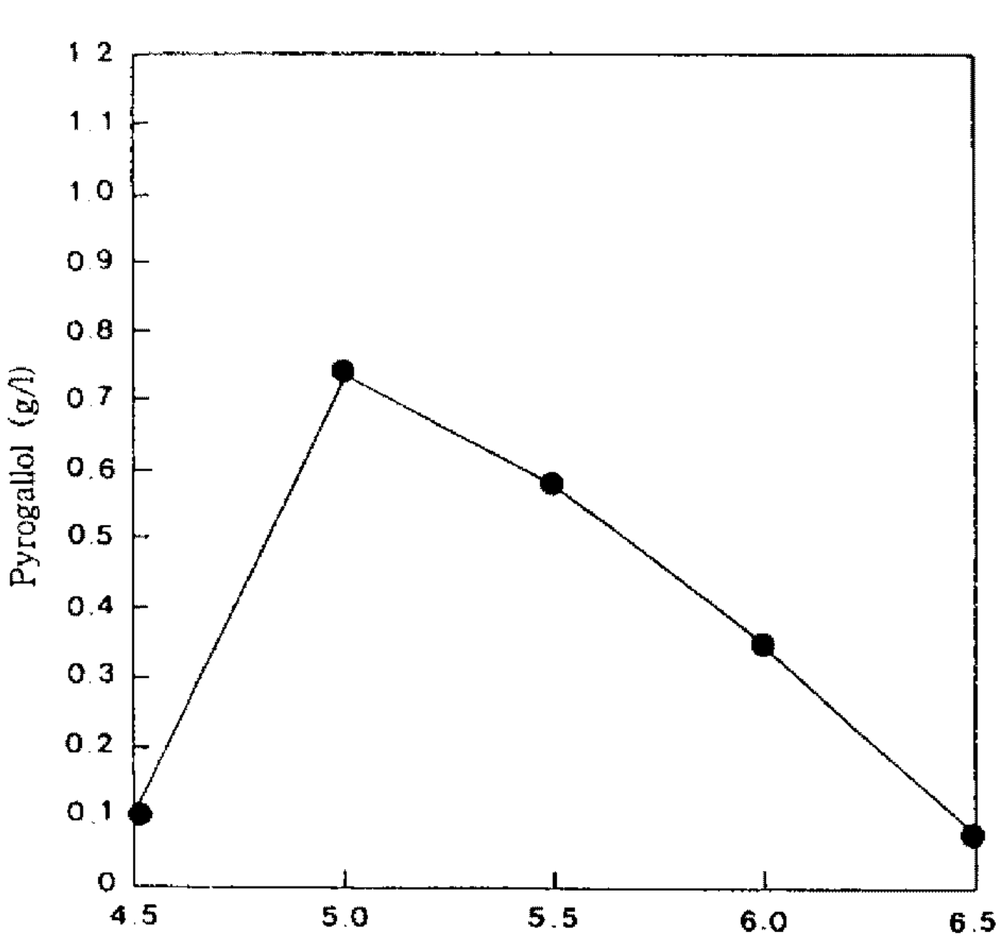

Fig. 4. Effect of initial pH on pyrogallol production with resting cells.
Reaction was carried out at 28℃ for 6 hrs in reaction mixture containing 6 g/*l* (wet weight) cell concentration, 15 g/*l* gallic acid, 1 mM ascorbic acid, and 50 mM potassium phosphate buffer.

저해로 인하여 pyrogallol의 생산이 감소하였다.

휴지세포에 의한 pyrogallol 생산시 pH의 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액의 buffer의 초기 pH를 4.5에서 6.5까지 변화시키면서 pyrogallol의 생성량을

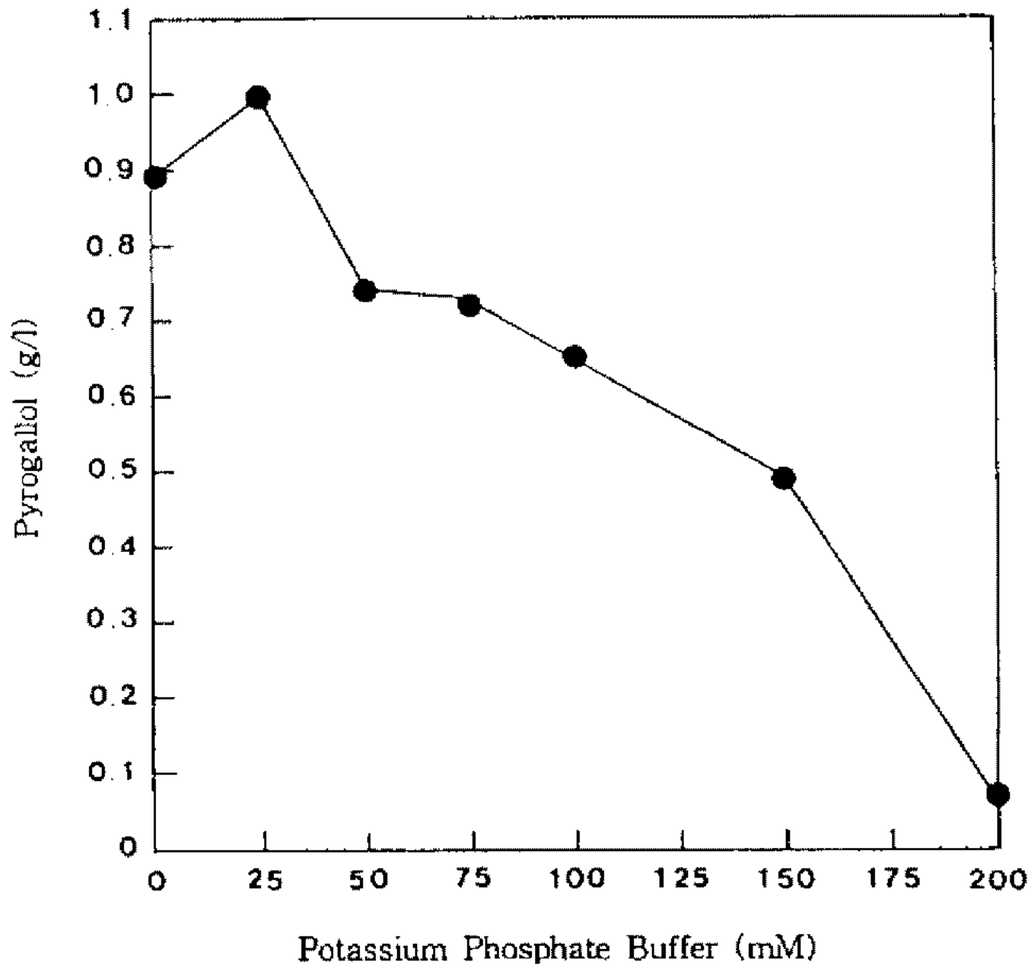

Fig. 5. Effect of buffer concentration on pyrogallol production with resting cells.
Reaction was carried out at 28℃ for 6 hrs in reaction mixture containing 6 g/*l* (wet weight) cell concentration, 15 g/*l* gallic acid, 1 mM ascorbic acid, and the reaction buffer was potassium phosphate buffer (pH 5.0).

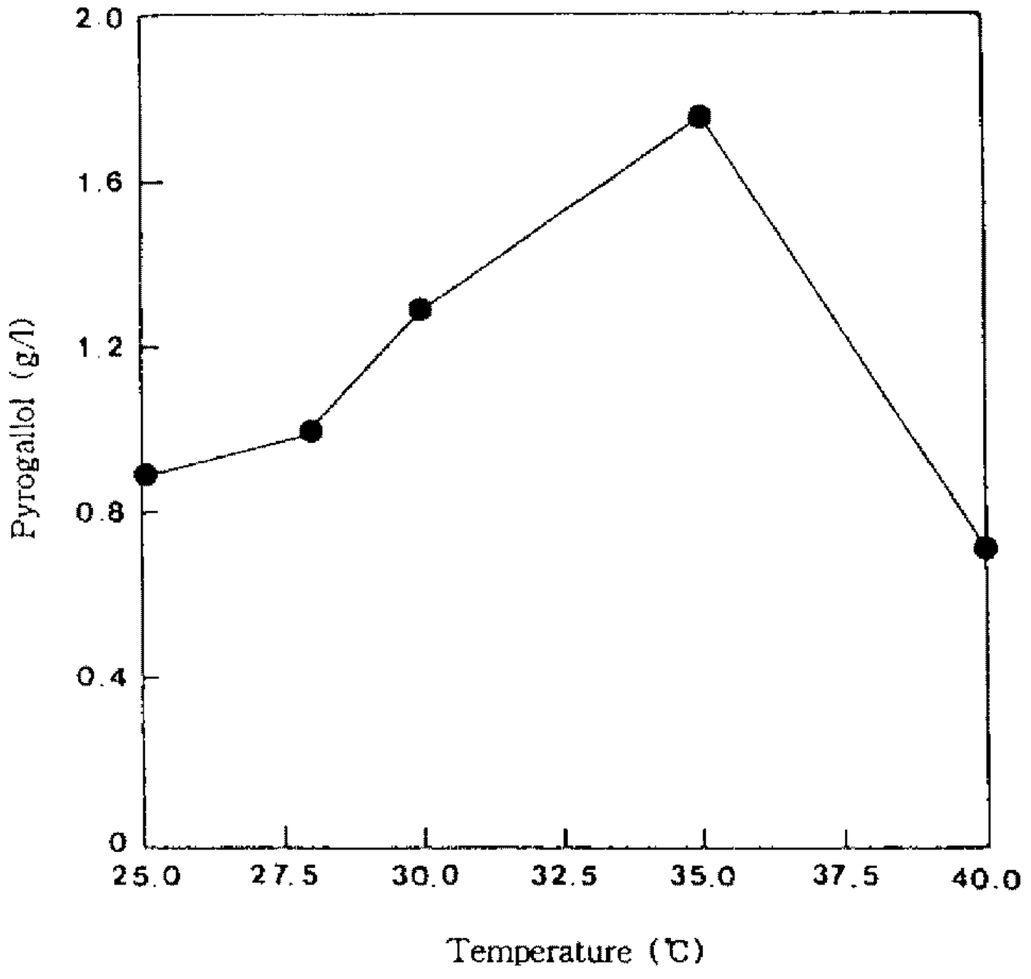

Fig. 6. Effect of reaction temperature on pyrogallol production with resting cells.
Reaction was carried out for 6 hrs in reaction mixture containing 6 g/*l* (wet weight) cell concentration, 15 g/*l* gallic acid, 1 mM ascorbic acid, and 25 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0).

조사한 결과 Fig. 4와 같이 반응의 최적 pH는 5.0이었으며, pH 5.0 이상과 이하에서는 매우 급격한 pyrogallol 생산의 감소를 나타냈다. 또한 사용된 반응혼합액의 potassium phosphate buffer의 농도의 변화에 따른 영향을 조사한 결과 Fig. 5와 같았으며, 25 mM의 buffer를 사용하였을 때 가장 좋았다.

휴지세포에 의한 pyrogallol 생산시 온도의 영향을 조사하기 위하여 반응액의 반응 온도를 25℃에서 40℃ 까지 변화시키면서 pyrogallol의 생성량을 조사한 결과 Fig. 6과 같이 pyrogallol의 생성량은 35℃ 전후에서 가장 좋았으며, 이후 온도가 높아짐에 따라 생성량은 급격히 감소하였다.

또한, 일반적으로 계면활성제는 미생물의 막 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(22, 23). 따라서 여러가지 양이온성, 음이온성 및 비이온성 계면활성제들이 pyrogallol 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응 혼합액에 각각 0.01%(w/v)와 0.1%(w/v)씩 첨가하여 첨가효과를 조사하였으며, Table 4와 같았다. 그 결과 pyrogallol 생산에는 대체로 비이온성 계면활성제를 0.01%(w/v) 첨가한 것이 좋았다. 비이온성 계면활성제 중에서는 Triton X-100를 0.01%(w/v) 첨가한 것이 가장 좋았으며 이때 대조구에 비하여 약 56.3% 증가한 pyrogallol이 생산되었다.

이상과 같이 상기의 결과로부터 얻어진 최적 조건

Table 4. Effect of various surfactants on pyrogallol production with resting cells

Surfactant	Concentration (%)	Pyrogallol (g/*l*)
None		1.76
Tween 40	0.1	1.90
	0.01	2.20
Tween 60	0.1	1.18
	0.01	2.05
Tween 80	0.1	2.10
	0.01	2.13
Triton X-100	0.1	1.93
	0.01	2.75
CTAB[1)]	0.1	0.06
	0.01	0.04
CPC[2)]	0.1	0.22
	0.01	0.50

*[1)]CTAB; Cetyltrimethyl ammonium bromide, [2)]CPC; Cetyl pyridium chloride
*Reaction was carried out at 35℃ for 6 hrs in reaction mixture containing 6 g/*l* cell concentration, 15 g/*l* gallic acid, 1 mM ascorbic acid, and 25 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0).

하에서 *Erwinia* sp. JH-004의 휴지세포에 의한 gallic acid로부터 pyrogallol 생산 반응시 반응액의 pH를 2시간마다 4 N HCl 용액으로 5.0으로 조정하면서 py-

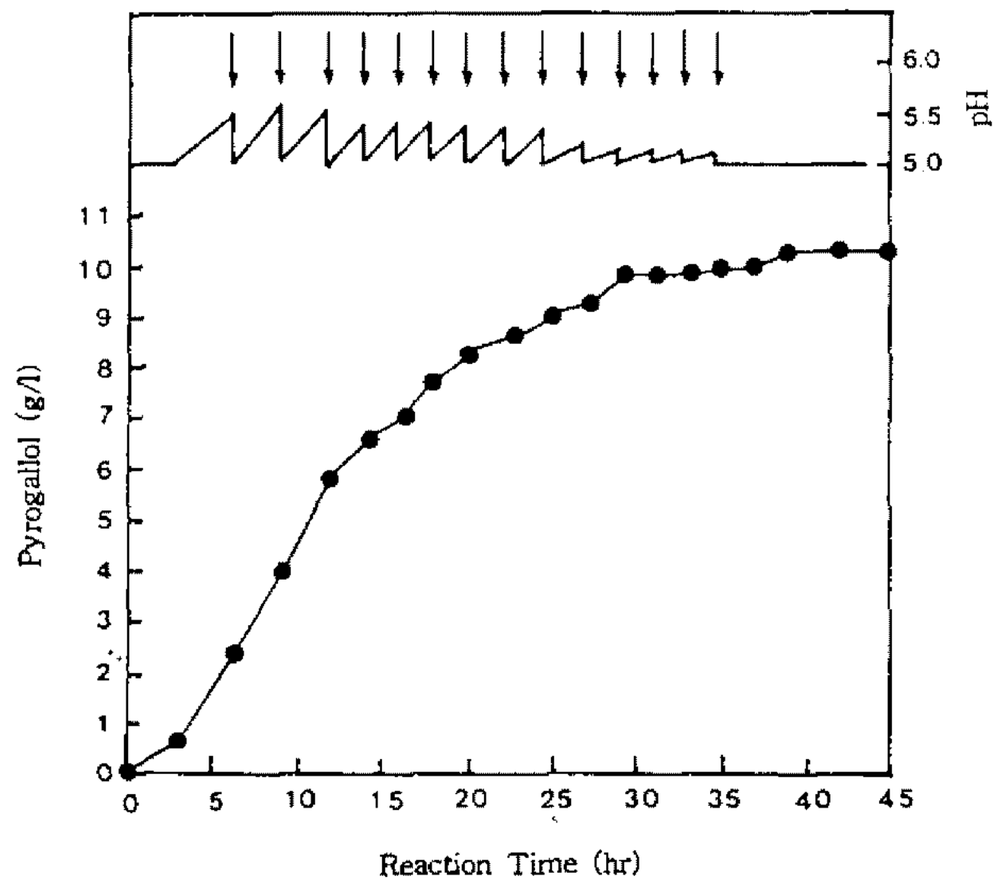

Fig. 7. Time course of pyrogallol production with resting cells.
Reaction was carried out at 35℃ in reaction mixture containing 6 g/*l* (wet weight) cell concentration, 15 g/*l* gallic acid, 1 mM ascorbic acid, 0.01%(w/v) Triton X-100, and 25 mM potassium phosphate buffer (pH 5.0). Arrows indicate the additions of 4 N HCl.

rogallol 생산량의 경시적 변화를 관찰하였으며, 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에서 나타난 바와 같이 생산량은 35시간 후에 최대를 나타내었다. 반응시간 35시간까지 15.0 g/*l*의 gallic acid로부터 10.27 g/*l*의 pyrogallol이 생산되었으며, 이는 이론적으로 사용한 gallic acid에 대한 pyrogallol로의 전환율은 92.37%에 해당하는 결과였다.

요 약

Gallic acid로부터 pyrogallol을 생산하기 위하여 토양으로부터 gallic acid를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 균주 100여종을 분리하였으며, 분리 균주들로부터 gallate decarboxylase (EC 4.1.1.59)의 비활성이 가장 높은 균주 JH-004를 선별하여, *Erwinia* sp.로 동정하였다. Gallic acid로부터 pyrogallol을 생산하기 위한 최적조건을 조사하기 위하여 0.2%(w/v)의 gallic acid가 포함된 완전배지에서 배양하여 수확한 후 1회 얼렸다 녹인 JH-004의 휴지균체를 효소원으로서 사용하였다. Pyrogallol 생산의 최적 반응액 조건은 25 mM potassium phosphate buffer에서 휴지균체 6 g/*l*와 gallic acid 15 g/*l*일 때였다. 최적 반응 pH는 5.0이었으며, 최적 반응온도는 35℃ 였다. 또한 계면활성제로서 Triton X-100 0.01% (w/v)를 사용하였을 때 pyrogallol 생산에 가장 효과적이었다. 최적조건하에서 반응시 35시간 후에 15 g/*l*의 gallic acid로부터 10.27 g/*l*의 pyrogallol이 생산되었으며, 이때의 전환율은 92.37%였다.

참고문헌

1. Raymond, E.K. and D.F. Othmer. 1953. Pyrogallol, Pp. 315-320. *In Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 2, The Interscience encylopedia Inc., New York.
2. Malcolm, D. and K.A.C. Elliott. 1930. The use of barcroft apparatus for the measurement of tissue respiration. *Biochem. J.* **24**: 820-833.
3. Happel, J. and S.P. Cauley. 1947. Tannins and allied chemicals in mercaptan removal processes. *Ind. Eng. Chem.* **39**: 1655-1659.
4. Philip, N.B., P. Tebbutt, and C.H. Tyrrell. 1992. Electrochemical immobilization of enzymes. 3. Immobilization of glucose oxidase in thin films of electrochemically polymerized phenols. *Anal. Chem.* **64**: 138-142.
5. Tanenbaum, S.W. and E.W. Bassett. 1958. The biosynthesis of patulin related aromatic substances from *Penicillium patulum* strain 2159A. *Biochem. Biophys. Acta.* **28**: 21-31.
6. Nishira, H. 1959. Degradative metabolism of tannin by molds. *Kagaku.* **29**: 42-43.
7. Descamps, A.M., G. Mahoudeau, M. Conti, and J.M. Lebeault. 1980. Bacteria degrading tannic acid and related compounds. *J. Ferment. Technol.* **58**: 93-97.
8. Grant, W.D. 1976. Microbial degradation of condensed tannins. *Science* **193**: 1137-1139.
9. Aoki, K., R. Shnke, and H. Nishira. 1976. Purification and some properties of yeast tannase. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 79-85.
10. Ramachandran, A., V. Subramanian, M. Sugumaran, and C.S. Vaidyanathan. 1979. Purification and properties of pyrocatechuate decarboxylase from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* **5**: 421-425.
11. Yoshida, H., Y. Tani, and H. Yamada. 1982. Isolation and identification of a pyrogallol producing bacterium from soil. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2539-2546.
12. 菊地護, 湯淺克己, 水澤清. 1986. ピロガロ-ルの製造法. 日本公開特許公報(A) 昭61-108393.
13. 山本英津子, 植田宏. 1988. 微生物によるピロガロ-ル, ピロカテコ-ルもしくはそれらの誘導體の製造方法. 日本公開特許公報(A) 昭63-49088.
14. Yoshida, H. and H. Yamada. 1985. Microbial production of pyrogallol through decarboxylation of gallic acid. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 659-663.
15. Kumar, R.A., A. Jayaraman, M. Lakshmanan,

and P. Gunasekaran. 1992. Bioconversion of gallic acid into pyrogallol by immobilized *Citrobacter freundii* TB3. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 159-162.
16. Pastuska, G. 1961. Silica gel layer chromatography of phenols and phenolcarboxylic acids. I. *Z. Anal. Chem.* **179**: 355-358.
17. Grant, D.J.W. and J.C. Patel. 1969. Determination of each constituent in mixtures of catechol and protocatechuic acid, quinol and gentisic acid, phenol and *p*-hydroxybenzoic acid, and pyrogallol and gallic acid. *Anal. Biochem.* **28**: 139-149.
18. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, and A.L. Farr. 1951. Protein measurement with folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
19. Sneath, P.H.A., N.S. Nair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol. 2, 8th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
20. Calcott, P.T. and R.A. Macleod. 1974. Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: a theoretical and practical study. *Can. J. Microbiol.* **20**: 671-681.
21. Fukumura, T. 1977. Bacterial racemization of α-amino-ε-caprolactam. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1321-1325.
22. Helenius, A. and K. Simons. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochem. Biophysics. Acta.* **415**: 29-79.
23. 大林晃. 1973. 微生物の對する表面活性劑の作用. *Amino acid. Nucleic acid.* **11**: 31-44.

(Received October 19, 1994)