

콩고오지 製造中の peptide 에 關한 研究

第三報 콩고오지 製造中에 生成되는 低級 peptide 의 構造

서울大學校 農科大學
農化學科

金 載 勗

(1965年 4月 20日 受理)

Studies on peptides during soybean-koji preparation Part III Amino acid sequence of oligopeptides formed during soybean-koji preparation.

Ze Uook Kim

Depart. of Agrochemistry
College of Agriculture
Seoul National University

Summary

(1) In order to study the specificity of *Aspergillus soya* protease to soybean protein, as well as the types of peptides formed during soybean-koji preparation the amino acid sequence for the di & tri-peptide and N-terminal amino acid residue and C-terminal amino acid residue were identified. As the results of the study, the following were obtained.

Gly. Glu.

Ala. Ser.

Glu. Ser. Ala.

Val (Cys, Glu, Ser, Ala, Arg, Try, Leu or Ileu)
Asp.

Phe (His, Arg, Cys, Asp, Ser, Ala, Leu or Ileu)
Glu.

Ala (Cys, Gly, Met) Glu.

Ala (Asp, Glu,) Gly.

Met (Asp, Glu, Ala, Tyr, Leu or Ileu, Lys.) Gly.

Leu or Ileu (His, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Thr,
Phe,) Cys.

Gly (Asp, Tyr,) Glu.

Pro (Asp, Glu, Ser, Gly, Thr, Ala, Val, Leu or
Ileu) Try.

Ser (Gly, Glu, Arg, Ala, Met, Leu or Ileu,) Asp.
Met (Asp, Glu, Ala, Try, Pro, Leu or Ileu,) His
Thr (Ser, Gly, Tyr, Pro, Leu or Ileu,) Glu.

Gly (Asp, Ala, Ser, Glu,) Leu or Ileu

(2) It has revealed that *Aspergillus soya* protease has considerably wider range of specificity than that of chymotrypsin, pepsin and trypsin but not mold protease and *Aspergillus saitoi* protease. It can be said that *Asp. soya* protease split the bond adjacent to glutamic acid, aspartic acid, glycine, serine, alanine, cystine, tryptophan, histidine preferably acidic amino acid as C-terminal amino acid residue.

一. 緒 論

著者は第一報⁽¹⁾에서 콩고오지 製造中에 經時的으로 採取한 試料에서 얻은 peptide 群液을 Dowex 50으로 分子篩別을 하여 여섯가지 fraction으로 分劃하였음을 報告하였고 第二報⁽²⁾에서는 X-16 fraction에 들어있는 低級 peptide의 amino acid pattern을 決定하였는데 콩고오지 製造中 生成된 peptide의

種類를 究明하는 同時에 兼하여 *Aspergillus soya* protease가 作用하는 specificity를 알기 爲하여 Sanger의 DNP-method와 hydrazinolysis에 依해 研究한 結果 이들 各 peptide에 對한 N-terminal amino acid residue 및 C-terminal amino acid residue와 함께 dipeptide 및 tripeptide의 amino acid sequence를 알아 냈음으로 여기에 그 結果를 報告하는 바이다.

二. 實驗方法

1) 試料 및 試藥

(1) 試料

第二報에서 paper chromatography로 分離하여 抽出한 各 peptide

(2) 試藥

A) Standard DNP-amino acid

第二報⁽²⁾에서 記述한대로 本實驗室에서 合成한 各 DNP-amino acid를 使用하였다.

B) 無水 hydrazine⁽³⁾⁽⁴⁾

E. Merk 會社製의 24% hydrazine hydrate를 蒸溜시켜서 約 80% 水溶液으로 한것 50g와 500g의 toluene 및 500g의 酸化칼슘을 함께 混合하여 흔들고 하룻밤 放置하였다. 이 混合物를 空氣中の 濕氣와 接觸하지 않게 하여 3時間 還流시킨 다음 93~94°C의 共沸點으로 蒸溜시켜 下層에 分離되는 것을 無水 hydrazine으로 使用하였다.

2) 實驗方法

(1) N-terminal residue 決定

第二報의 實驗에서 30枚의 paper에서 切取 抽出하여 얻은 各 peptide에 DNFB를 作用시켜서 diphenyl 化시키고 여기에 5.7 N-HCl 3ml를 가하여 封管하고 105°C에서 20時間 加水分解⁽⁵⁾시킨 다음 이것을 KOH와 P₂O₅를 넣은 減壓 desiccator에서 HCl을 除去하고 濃縮한 다음 第二報 實驗 6에서 Mills方法으로 DNP를 除去한 sample 一部分을 사용하여 free amino acid의 pattern을 확인한 나머지 一部分을 acetone에 녹여 第二報에서 記述한 바와 같이 tert-amyl alcohol saturated with phthalate buffer(pH 6.0) 및 1.5 M phosphate buffer(pH 6.0) solvent system으로 展開시켜 N-terminal amino acid residue를 同定하였다. 이와같은 操作으로 얻은 結果에서 DNP-amino acid spot가 나타나지 않은것은 glycine이 N-terminal amino acid임으로서 위의 條件으로 加水分解할 때 破壞된 것으로 간주하고 다시 5.7 N HCl로 105°C에서 4시간 加水分解⁽⁵⁾하여 chromatography하여 結果를 얻었다.

(2) C-terminal amino acid residue의 決定

C-terminal amino acid residue을 決定하는 方法에 는 Chibnall and Ress⁽⁶⁾ 등이 LiBH₄를 使用하여 free terminal carboxyl group을 carbinol (CH₂OH)基로 환원시킨다음 加水分解시켜 Chromatography로 同定한 方法이나 Akabori⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ 등이 100°C에서 protein에 無水 hydrazine을 作用시켜 peptide bond를 開裂시키고 C-terminal amino acid 以外の 아미노기를 hydrazide (-CONH NH₂)로 만들고 이것을 不溶性化合物로 轉換시켜 除去한 다음 遊離된 C-terminal만을 chromatography로 同定하는 法이 있으며 其他 carboxy peptidase⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹⁵⁾를 作用시켜 同定하는 方法이 있다. 著者は 이中 Akabori의 hydrazinolysis를 modification한 J.H. Bradbury⁽¹⁵⁾의 方法에 따라 各 peptide의 C-terminal amino acid residue를 同定하였다.

即 peptide를 分離하기 爲하여 二次로 展開시킨 paper 60장에서 各 peptide를 elute하여 P₂O₅를 넣은 減壓 desiccator中에서 完全히 乾燥시키고 여기에 hydrazine sulfate 26mg을 측대로 넣어 室溫에서 10⁻⁴mm Hg의 壓力으로 減壓시켜서 3時間 充分히 乾燥시킨 後 無水 hydrazine 0.2ml을 加하여 封管하였다. amino acid中 cysteine, cystine, arginine, aspartic acid, glutamic acid의 破壞를 막기 爲해 60°C의 比較的 弱한 條件下에서 16時間 加熱하여 加水分解시켰다. 過剩의 hydrazine은 濃硫酸을 넣은 vacuum desiccator 속에서 完全히 蒸發시킨 다음 0.1N HCl 1ml에 녹이고 여기에 benzaldehyde를 加하여 2時間 흔들어서 生成된 hydrazide를 condensation시켜서 不溶性物質로 沈澱시켰다. 이것을 遠心分離하여 水溶性層을 分離해 냈다. 이 試料를 KOH와 P₂O₅를 넣은 減壓 desiccator에 넣어 HCl을 除去하고 濃縮시켜 그중 一部分의 試料를 Levy⁽¹⁷⁾의 方法으로 M/2 carbonate buffer⁽¹⁸⁾에 녹여 室溫에서 3時間 dinitrophenyl 化시켰다. 過剩의 DNFB를 ether로 除去하고 濃 HCl을 加하여 pH 1로 酸性化시킨 後 ether 5×5ml 및 ethyl acetate 5×5ml로 抽出한 다음 Mills⁽¹⁹⁾의 方法으로 DNP를 除去하고 第二報에서 記述한 바와같이 다음과 같은 溶媒를 使用하여 二次로 展開시켰다.

Ether soluble DNP-amino acid

tert-amyl alcohol—N/10 phthalate buffer
(pH 6.0) saturated

1.5 M phosphate buffer (pH 6.0)

Water soluble DNP-amino acid

n-Butanol—1% ammonia (1:1 v/v)

0.75 M phosphate buffer (pH 6.0)

이 결과로서 paper 에는 C-terminal 에서 遊離된 DNP-amino acid 는 overlap 된 DNP-amino acid 와 또한 hydrazinolysis 시켰을 때 完全히 分解 못한 peptide 도 DNP-derivative 를 形成하여 나타났으나 그 量이 顯著하게 많은 것을 C-terminal amino acid 로 決定하였다. 一便 나머지 小量의 試料을 Whatman filter paper No. 1 을 使用하여 第 2 報에서 記述한 BuOH : HAC : H₂O = 4:1:1 (v/v), PhOH : H₂O = 3:1 saturated with HAC 0.5% 溶媒로 二次元으로 展開시켜 0.2% ninhydrin acetone 溶液으로 發色시켜 amino acid pattern 을 보아 檢出되는 amino acid 를 C-terminal 로 同定하여 먼저 方法에 依한 結果를 再確認하였다.

(3) Molar ratio^{(16) (17)}

二次元으로 展開하여 peptide 를 分離하기 爲한 paper 20 枚에서 peptide 를 elute 하여 濃 HCl 을 加하여 20% 濃度로 調整하고 150°C 에서 6 時間 加水分解를 시킨다음 KOH 와 P₂O₅ 를 넣은 減壓 desiccator 에서 HCl 을 除去 濃縮하고 이를 Levy⁽¹⁷⁾ 의 方法으로 dinitrophenyl 化시켰다. DNFB 를 ether 로 除去하고 酸性化하여 ether 및 ethyl acetate 로 抽出하였다. Mills⁽¹⁶⁾ 의 方法으로 DNP 를 除去하고 acetone 에 녹여 15×35 cm 크기의 Whatman filter paper No. 4 의 한쪽 끝 7 cm 되는 部分에 band spotting 을 하여 前記한 tert-amyl alcohol—1/10 M phthalate buffer (pH 6.0) saturated 溶媒 및 1.5 M phosphate buffer (pH 6.0) 를 써서 一次로 展開하여 DNP-amino acid 를 分離한 다음 각 peptide 에 overlap 된 amino acid 의 DNP-derivative 는 除外하고 각 peptide 의 構成 amino acid 及 DNP-derivatives 가完

全히 包含되도록 5 枚式 똑같은 紙를 짧게 切斷하여 test tube 에 넣고 H₂O 4 ml 을 넣은後 water bath 에서 50~60°C 로 15 時間 加熱하였다. 이것을 室溫으로 冷却시킨다음 傾瀉하여 얼은 抽出液을 正確히 5 ml 씩으로 채우고 Beckman model DU spectrophotometer 를 使用하여 360 mμ 波長에서 O.D 를 測定하였다. 이와같이 하여 얻은 O.D 에 다음 의 factor 를 곱하여 molar ratio⁽¹⁷⁾ 을 定한다.

Glu. 0.94	Ser. 0.97
Gly. 1.03	Ala. 1.09

三. 結果 및 考察

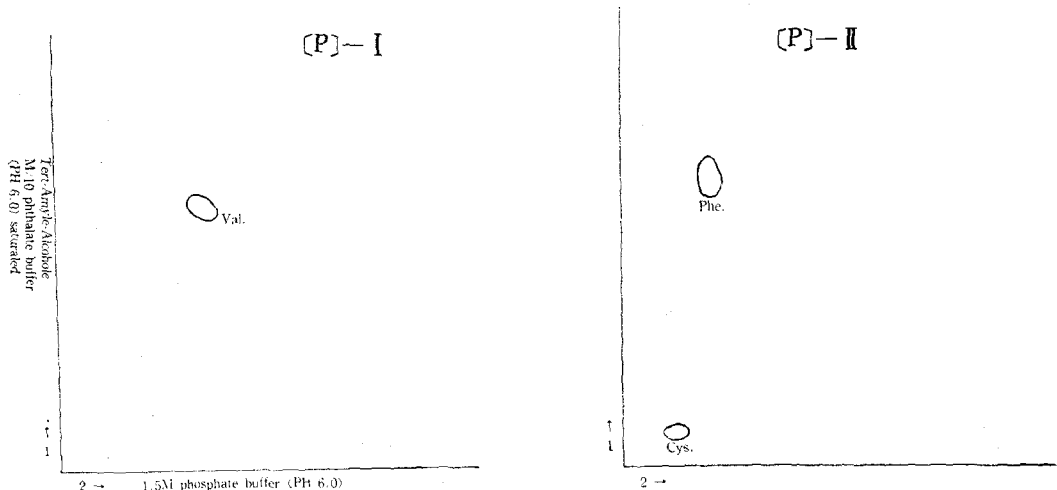
(1) N-terminal amino acid residue 의 決定

實驗 (1) 의 方法에 依하여 各 peptide 를 dinitrophenyle 化시키고 加水分解시킨 다음 HCl 을 除去하여 Whatman filter paper No. 4 를 使用하여 二次元으로 展開시킨 結果는 第 1 圖와 같다.

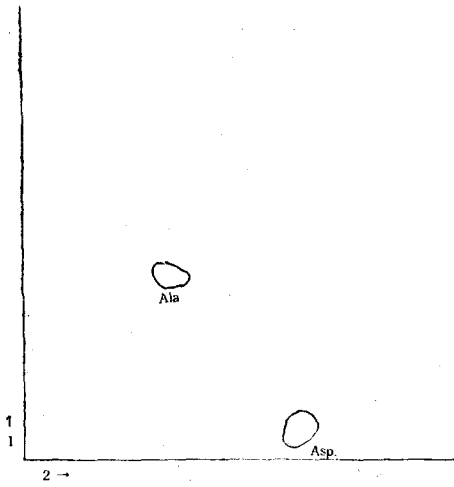
第一圖의 paper chromatogram 에서 [P]—I, [P]—IV, [P]—V, [P]—VII, [P]—IX, [P]—XI 및 [P]—XIV 은 모두 1 個의 DNP-amino acid 에 該當되는 yellow spot 을 確認할 수 있어 이것을 standard DNP-amino acid 와 對照한 結果 쉽게 同定할 수 있었으며 [P]—II, [P]—III, [P]—VIII, [P]—X, [P]—XII, [P]—XIII 및 [P]—XV 는 2 個의 yellow spot 가 나타나 이 중 하나는 overlap 된 free amino acid 에서 由來된 것이므로 이를 除外한 다른 spot 을 N-terminal residue 를 決定하였다. 그리고 [P]—VI 은 yellow spot 4 개中 3 개는 overlap 된 free amino acid 이고 나머지 1 個가 N-terminal residue 이다.

이 結果를 綜合하면 第 1 表와 같다.

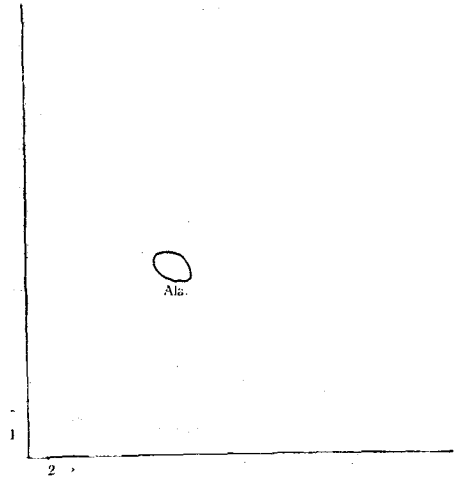
Fig. 1 Paperchromatogram of N-terminal amino acid of peptides



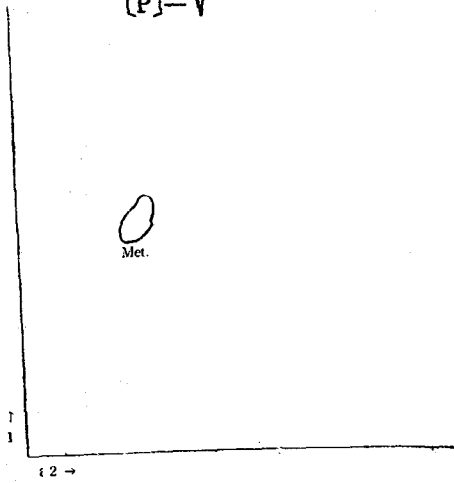
[P]-I



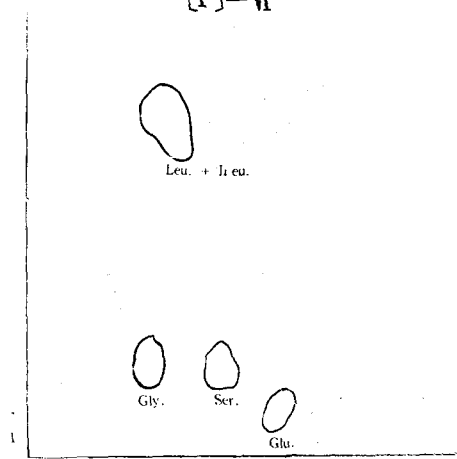
[P]-IV



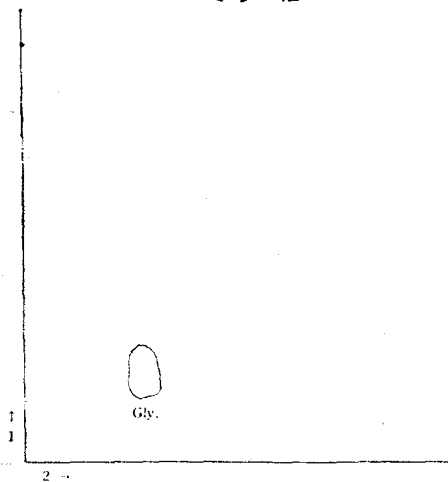
[P]-V



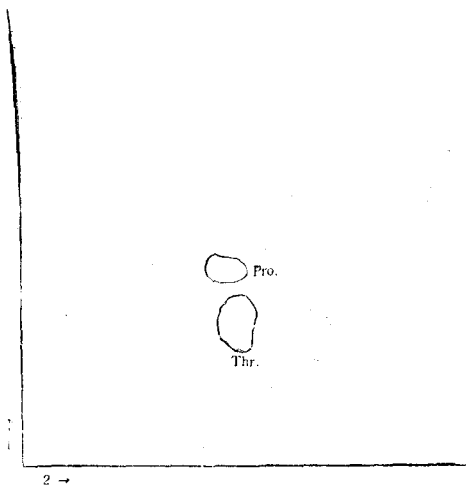
[P]-VI



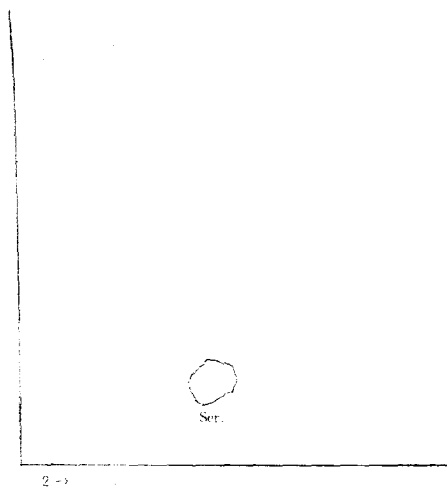
[P]-VII



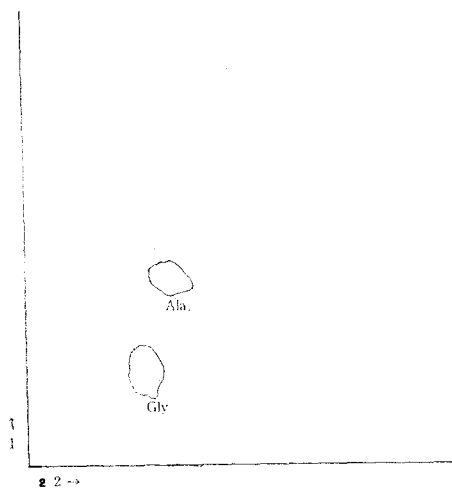
[P]-VIII



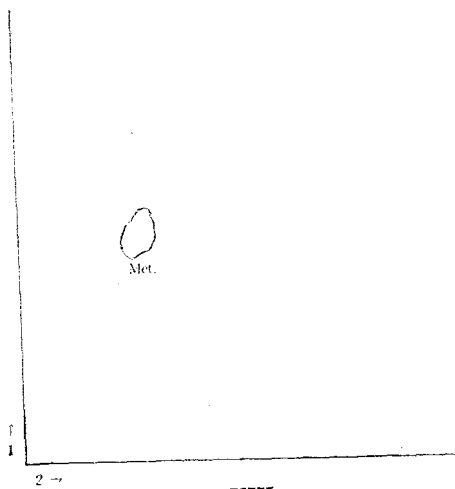
[P]-IX



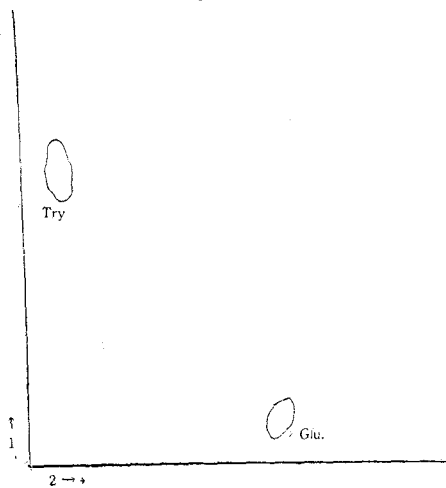
[P]-X



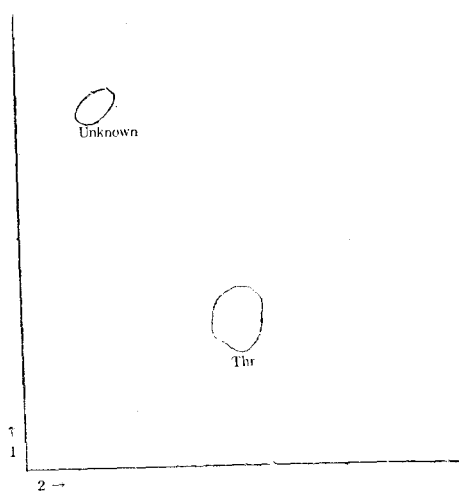
[P]-XI



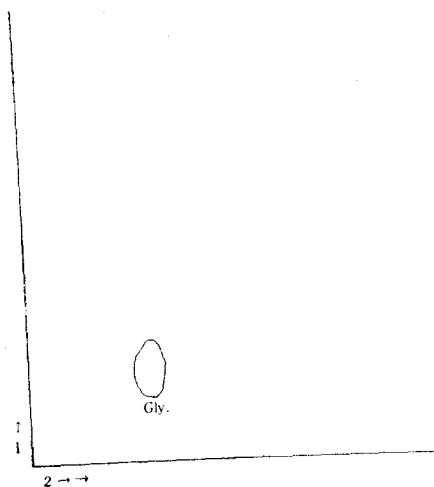
[P]-XII



[P]-XIII



[P]-XIV



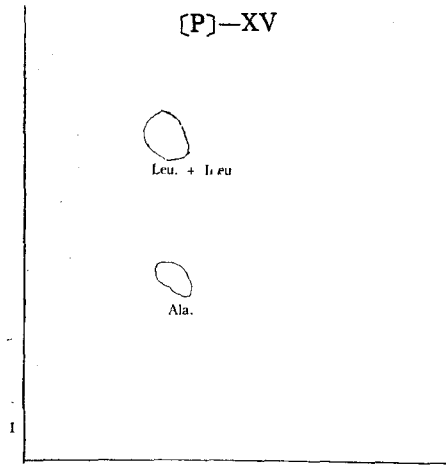
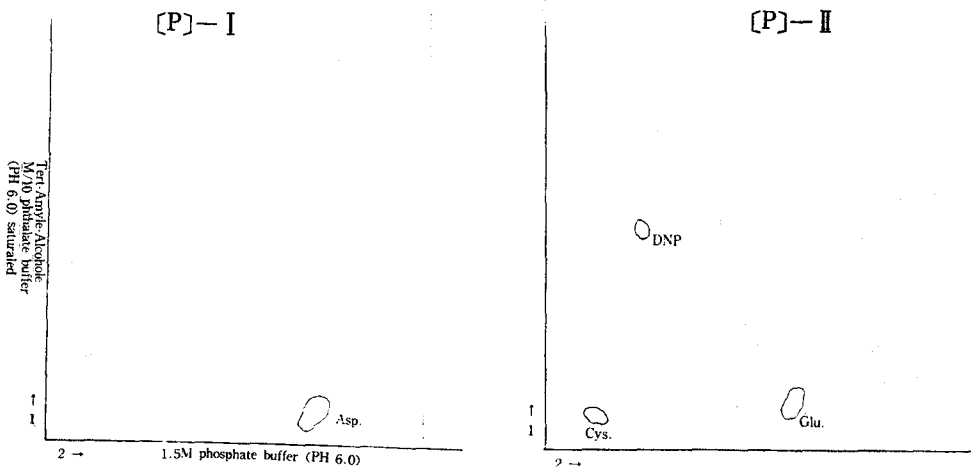


Table 1. N-terminal amino acid residues of each peptide

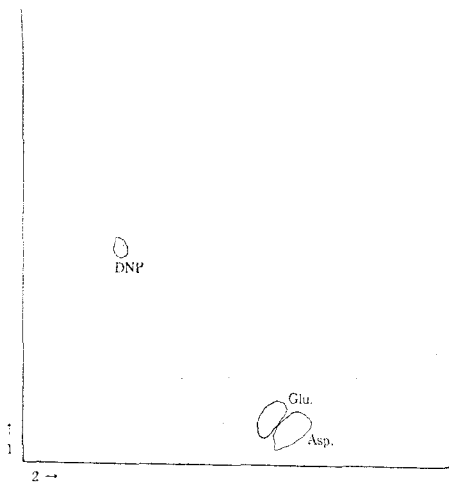
peptide No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
identified corresponding amino acids	Val	Phe Cys	Ala Asp	Ala	Met	Glu Ser Gly Leu or Ileu	Gly	Thr Pro	Ser	Ala Gly	Met	Try Glu	Thr unk- nown	Gly	Ala Leu or Ileu
overlap ped amino acid		Cys	Asp			Glu Ser Gly		Thr		Ala		Try unk- nown			Leu or Ileu
N-terminal amino acids	Val	Phe	Ala	Ala	Met	Leu or Ileu	Gly	Pro	Ser	Gly	Met	Glu	Thr	Gly	Ala

(2) C-terminal amino acid residue의 決定 物質로 沈澱시킨 다음 水性層을 分離하여 dinitro-
 各 peptide를 無水 hydrazine을 써서 hydrazin- henyl 化시켜서 二次元으로 展開시킨 結果는 第2圖
 olisis를 일으키고 benzaldehyde를 加하여 不溶性 와 같다.

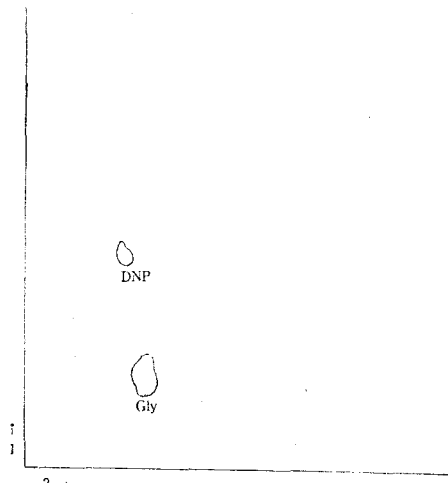
Fig. 2. Paper chromatogram of C-terminal amino acid residues of each peptide



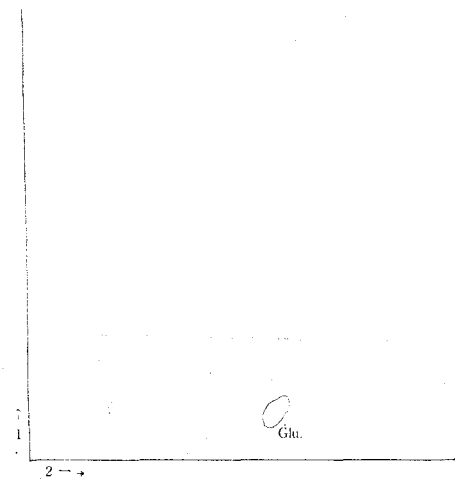
[P]-II



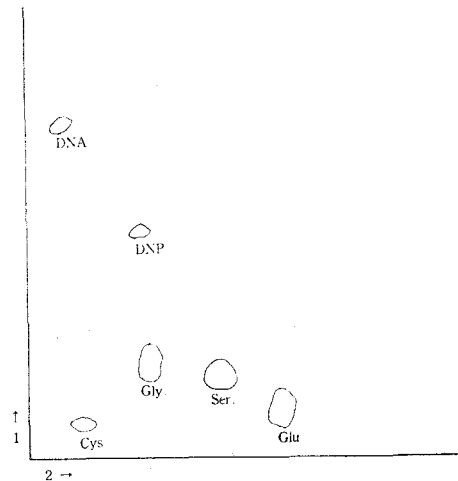
[P]-IV



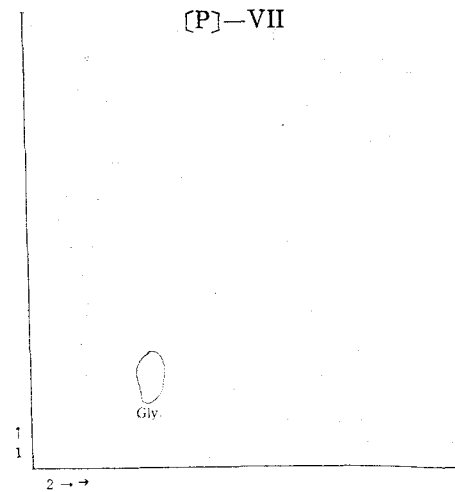
[P]-V



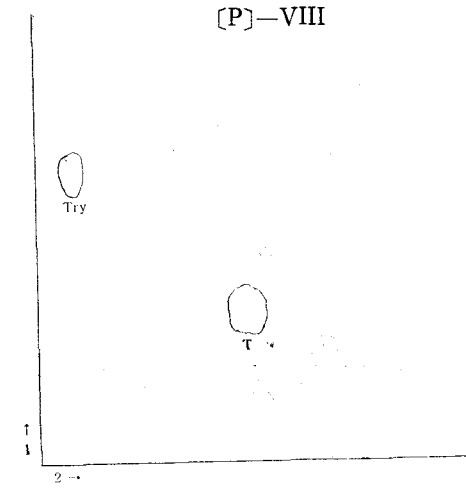
[P]-VI

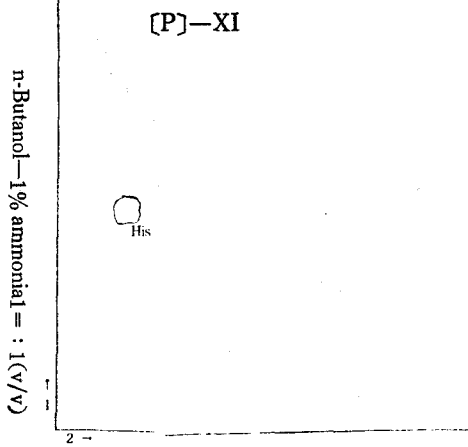
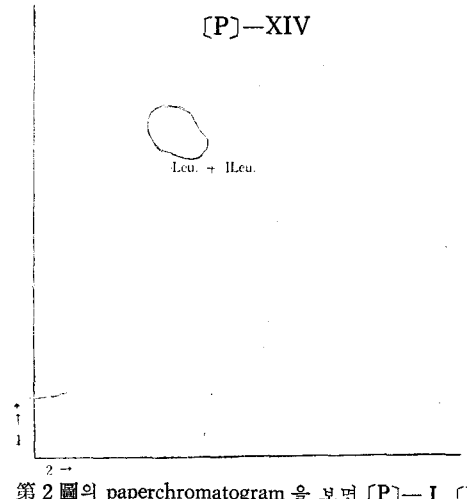
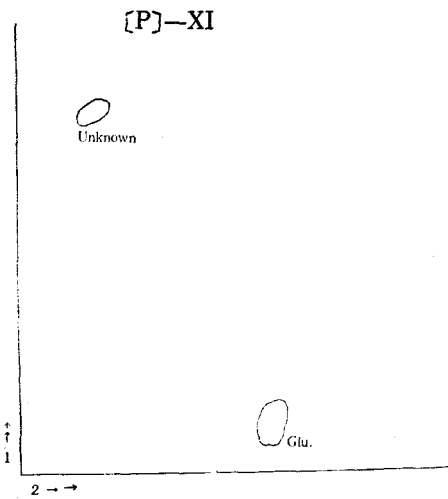
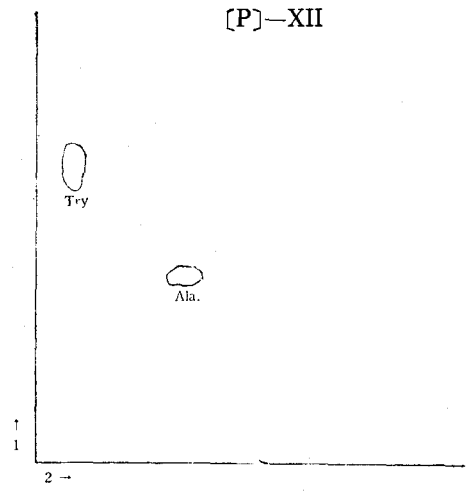
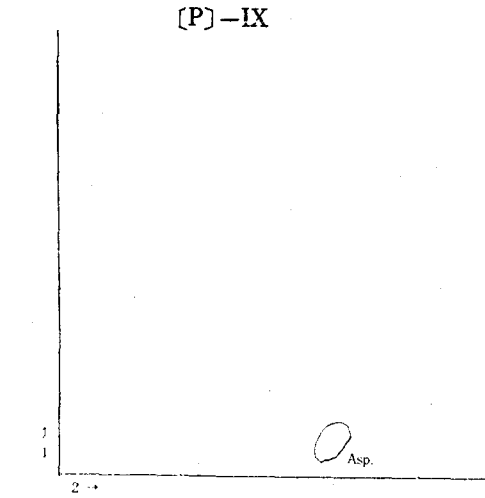


[P]-VII



[P]-VIII





0.75M phosphatebuffer (pH 6.0)

第2圖의 paperchromatogram 을 보면 [P]-I, [P]-IV, [P]-V, [P]-VII, [P]-IX, [P]-XI, 및 [P]-XIV는 DNA, DNP spot 등을 除外하면 main yellow spot 가 1個로 나타나서 standard DNP-amino acid 와 對照한 結果 [P]-III 以外の peptide 는 各各 單一한 DNP-amino acid 로 同定이 되나 [P]-III 는 이것이 glutamic acid 및 aspartic acid 位置로 되어 이것의 單一한 DNP-amino acid 인지 2個가 overlap 된 것인지 알기가 어렵게 되었다. [P]-II 는 3個, [P]-VII, [P]-XII 및 [P]-XIII 는 main spot 가 2個로 나타나서 [P]-II 는 cystine 및 glutamic acid 의, [P]-VII 는 threonine 및 tryptophan 의, [P]-XII 는 tryptophan 과 alanine 의, [P]-XIII 는 glutamic acid 및 unknown amino acid 의 DNP derivative 로 나타나며 [P]-VI 은 DNA 및 DNP 를 除外한 main spot 가 4個로 나타나서 cystine, glutamic acid, serine 및 glycine 의 DNP derivative 로 同定되었다.

따라서 以上の 結果를 再確認하는 同時에 特히 [P]-III의 DNP-amino acid spot가 DNP-glutamic acid 및 DNP-aspartic acid中 單一한 것인지 두가지 DNP-amino acid가 overlap되어 나타난 것인지 究明하기 爲하여 上記 試料中 少量의 水性層試料를 取하여 Whatman filter paper No. 1을 使用하여 二次元으로 展開하여 amino acid를 同定한 結果 [P]-III에서는 aspartic acid 및 glutamic acid의 두가지

amino acid가 모두 同定되었다. 其他 peptide에서 도 第2圖에서 얻은 結果와 잘 一致되었다.

以上 同定된 amino acid의 種類는 C-terminal amino acid와 各 peptide에 overlap된 free amino acid의 種類일 것임으로 이들 amino acid에서 第二報 第5表의 overlap된 amino acid를 除去하면 C-terminal amino acid가 될 것이다. 이것을 綜合하면 第2表와 같이 된다.

Table 2. C-terminal amino acid residues of each peptide

peptide No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	XI	XII	XIII	XIV
identified amino acids	Asp.	Cys Glu	Glu Asp	Gly	Gly	Cys Glu Ser Gly	Glu	Thr. Try	Asp.	His	Try Ala	Glu unkn- own	Leu or Ileu
overlaped amino acid		Cys.	Asp.			Glu Ser. Gly		Thr			Try	unkn- own	
C-terminal amino acsd	Asp.	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Try	Asp	His	Ala	Glu	Leu or Ileu

(3) Molar ratio

低級 peptide인 [P]-X, [P]-XII, [P]-XV의 加水分解物을 dinitrophenyl 化시켜 paper로 分離한 것

을 抽出하여 Beckman model D.U Spectrophotometer로 O.D를 測定한 結果에 各 該當係數를 곱하여 얻은 molar ratio는 第3表와 같다.

Table 3. Molar ratio of lower peptidesd

Peptide No.	DNP-amino acid	O. D	factor	molar ratio
X	DNP-glycine	0.811	1.03	0.8353
	DNP-glutamic Acid	0.895	0.94	0.8413
XII	DNP-glutamic Acid	0.503	0.94	0.4728
	DNP-serine	0.402	0.97	0.4779
	DNP-alanine	0.437	1.09	0.4763
XV	DNP-alanine	0.348	1.09	0.3792
	DNP-serine	0.404	0.97	0.3918

第2表의 結果는 [P]-X, [P]-XII 및 [P]-XV는 어느 것이나 各 構成 amino acid間에 Molar ratio가 1:1로 되어 있는 것을 알 수 있다.

以上の 結果와 第二報에서의 各 peptide의 構成 amino acid pattern을 綜合하여 보면 [P]-X는 glycine 및 glutamic acid [P]-XV는 alanine 및 serine으로 構成되어 있고 또한 molar ratio가 1:1인 까닭에 dipeptide가 아니면 tetrapeptide 또는 그 以上 두가지 amino acid가 같은 molar ratio로 含有된 偶數의 peptide chain으로 된 peptide일 수 있는 可能性이 있다. 그러나 第二報의 第7表에서 pep-

tide의 N-terminal amino acid를 除外한 構成 amino acid가 [P]-X는 glutamic acid, [P]-XV는 serine만으로 되어 있는 것으로 보아 dipeptide임을 알 수 있고 [P]-XII도 N-terminal amino acid를 除外한 構成 amino acid로서 serine 및 alanine만이 同定되는 것으로서 tripeptide임을 알 수 있다. 따라서 同定된 N-terminal, C-terminal amino acid와 構成 amino acid에서 얻어지는 이들 低級 peptide의 amino acid sequence를 Brand E. & Edsall J.T⁽²⁰⁾의 法으로 表示하면 다음과 같이 된다.

[P]-X Gly. Glu

[P]-XV Ala. Ser

[P]-XII Glu. Ser. Ala

또한 第1表의 各 peptide 의 N-terminal, 第2表의 C-terminal amino acid 와 第二報의 第8表를 綜合하면 tetrapeptide 以上の peptide 의 構成은 다음과 같이 表示할 수 있다.

[P]-I Val (Cys, Glu, Ser, Ala, Arg, Try, Leu or Ileu) Asp.

[P]-II Phe (His, Arg, Cys, Asp, Ser, Ala, Leu or Ileu) Glu.

[P]-III Ala (Cys, Gly, Met,) Glu

[P]-IV Ala (Asp, Glu) Gly

[P]-V Met (Asp, Glu, Ala, Tyr, Leu or Ileu, Lys) Gly.

[P]-VI Leu or Ileu, [His, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys, Thr, Phe) Cys.

[P]-VII Gly (Asp, Tyr,) Glu

[P]-VIII Pro (Asp, Glu, Ser, Gly, Thr, Ala, Val, Leu or Ileu) Try

[P]-IX Ser (Gly, Glu, Arg, Ala, Met, Leu or Ileu) Asp.

[P]-XI Met (Asp, Glu, Ala, Try, Pro, Leu or Ileu) His

[P]-XIII Thr (Ser, Gly, Tyr, Pro, Leu or Ileu) Glu

[P]-XIV Gly (Asp, Ala, Ser, Glu) Leu or Ileu.

(1) Aspergillus soya protease 의 作用 specificity 는 chymotrypsin pepsin 및 trypsin⁽²¹⁾ 보다는 넓으나 Crewther et al⁽²²⁾ 이 報告한 mold protease(pH 8.0) 및 Yoshida et al⁽²³⁾ 이 報告한 Aspergillus saitoi protease 의 作用 specificity range 보다는 좁다.

(2) Aspergillus soya protease 는 C-terminal residue 가 basic amino acid 인 것에는 作用하지 않는 것으로 보이며 주로 acidic amino acid 를 C-terminal 로 가진 것에 specificity 가 크며 특히 glutamic acid 에 잘 作用하는 것으로 보인다.

五. 摘 要

(1) 콩고오지 製造中 生成되는 低級 peptide 의 種類를 究明하는 同時에 兼하여 Aspergillus soya protease 의 作用 specificity 를 究明하기 爲하여 콩고오지 製造中 生成되는 低級 peptide 의 N-terminal 및 C-terminal 을 同定하고 dipeptide 및 tripeptide 에 對하여서는 amino acid sequence 를 決定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

Gly. Glu.

Ala. Ser

Glu. Ser. Ala

Val (Cys, Glu, Ser, Ala, Arg, Try, Leu or Ileu) Asp.

Phe (His, Arg, Cys, Asp, Ser, Ala Leu or Ileu) Glu

Ala (Cys, Gly, Met) Glu.

Ala (Asp, Glu) Gly

Met (Asp, Glu, Ala, Tyr, Leu or Ileu, Lys) Gly

Leu or Ileu (His, Asp, Glu, Gly, Ser, Lys Thr, Phe) Cys

Gly (Asp, Tyr) Glu

Pro (Asp, Glu, Ser, Gly, Thr, Ala, Val, Leu or Ileu) Try

Ser (Gly, Glu, Arg, Ala, Met, Leu or Ileu) Asp

Met (Asp, Glu, Ala, Try, Pro, Leu, or Ileu) His Thr (Ser, Gly, Tyr, Pro, Leu or Ileu)Glu

Gly (Asp, Ala, Ser, Glu) Leu or Ileu

(2) Aspergillus soya protease 의 作用 specificity 는 比較的 廣範圍하며 carboxyl 基를 가진 amino acid 가 acidic amino acid 일 때 잘 作用하는 것으로 보인다.

끝으로 本研究을 遂行함에 있어서 校閱과 始終 指導 鞭撻을 아끼지 않으신 本大學學長 金浩植博士 를 비롯하여 本科主任教授 李春寧博士, 本科教授 李成煥博士 서울大學 醫科大學教授 李基寧博士님께 衷心으로 感謝를 드리며 아울러 本實驗遂行에 있어 獻身助力하여준 本大學校 大學院 邊時明君에게 謝意를 表하는 바이다.

引用 文 獻

1) 金載勳 本誌 6 79(1965)

2) 金載勳 本誌 6 89(1965)

3) J. L. Bailey; Techniques in protein chemistry p. 206 (1962)

4) F. Raschig; Ber. dent. chem. Ges, 43 1927 (1910)

5) F. Sanger and H. Tuppy; Biochemical J. 49 463(1951)

6) A.C. Chibnall and M.W. Rees, G.E.W. Wolstenholme; The Chemical Structure of protein, J and A Churdrill, London, (1953)

7) S. Akabori K. Ohno and K. Narita; Bull. Soc Chem. Japan. 25 214 (1952)

8) G. Braunitzer; Chem Ber, 88 2025 (1955)

9) C.H.W. Hirs, S. Moore and W. H. Stein.; J. B.C 235 633 (1960)

- 10) H.I. Silman, J. J. Cobra and D. Givol; J. B.C. **237** 2196 (1962)
- 11) R.H. Locker; Biochem. Biophys Acta, **14** 532 (1954)
- 12) C. Niu and H. Fraenkel-conrat ;J. Amer. Chem. Soc. **77** 5882 (1955)
- 13) K.J. Ohno; Biochem, Japan **40** 621 (1953)
- 14) K.J. Ohno; Biochem. Japan **41** 345 (1954)
- 15) H. Fraenkel-Conrat J.I. Harris A.L. Levy in D. Glick Editor; Method of Biochemical Analysis Vol. **2** Interscience publishers, Inc., New York p. 359 (1955)
- 16) J.H. Bradbury; Nature **178** 912 (1956)
- 17) A.L. Levy.; Nature **174** 126 (1954)
- 18) A.L. Levy, Geschwind, I.I., & H. Lic; J. Biol.; chem, **213** 187 (1955)
- 19) G.L. Mills; Biochem, J. **50** 707 (1952)
- 20) E. Brand and J.T. Edsall; Ann. Biochem. **16** 224(1947)
- 21) F. Sanger and H. Tuppy; Biochem J. **49** 481 (1951)
- 22) W.G. Crewther and F.G. Lennox,; Nature **165** 680 (1950)
- 23) Yoshida and Ichishima; Agr. Biol. Chem. Japan. **25** 192 (1951)