

# 高溫性 放線菌에 의한 酵素生産에 관한 研究

## 第 1 報 $\alpha$ -Amylase生産菌의 分離 및 酵素生産 條件

梁 漢喆 · 金 凡煥 · 崔 瑢鎮

高麗大學校 農科大學 食品工學科

## Studies on the Production of Enzymes by Thermophilic *Actinomycetes*

### Part I. Isolation and Culture Conditions of Thermostable $\alpha$ -Amylase Producing *Actinomycete*

Han-Chul Yang, Bum-Hwan Kim and Yong-Jin Choi

Dept. of Food Technology, College of Agriculture,  
Korea University. Seoul, Korea (Received May 30, 1975)

#### Abstract

In the course of studies on the production of thermostable amylases by thermophilic actinomycetes isolated from soils the investigation was carried out on the production of  $\alpha$ -amylase by G-1011 strain which had presented the most remarkable  $\alpha$ -amylase formation ability among 128 amylolytic isolates.

The results were as follows:

1. Characteristics of G-1011 strain were compared with those descriptions of thermophilic actinomycetes given in Bergey's Manual. The strain was identical to these species of actinomycetes. The details of physiological properties of the strain would be published in near future.
2. The optimum temperature for incubation of the cell growth of G-1011 strain and  $\alpha$ -amylase production by the strain was revealed to 50°C.
3. The effective medium for  $\alpha$ -amylase formation by the strain was consisted of 3.0%, soluble starch, 1.0%, peptone, 0.5%, yeast extract, 0.5%, NaCl, 0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%,  $K_2HPO_4$  and 0.002%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ . The pH of the medium was adjusted to 7.0 with phosphate buffer solution.
4. The maximum production of  $\alpha$ -amylase (3420 D. U/ml) by G-1011 strain resulted when it was grown for 16 hours with the culture of reciprocal shaking.

#### 序 論

高溫性 放線菌은 일반적으로 50°C 이상의 高溫 環境에서 生育하는 放線菌을 말하며<sup>(1)</sup> 土壤, 堆肥 乾草 등 自然界에 널리 分布하고 있으면서 各種의 有機質을 分解하여 腐殖土나 堆肥熟成에 중요한 역할을 하며<sup>(2)</sup> 때로는 人間이나 家畜에 대하여 직접 害를 끼치는 경우도 있다<sup>(3,4)</sup>.

반면 高溫性 放線菌은 各種의 加水分解酵素 특히 耐熱性이 강한 酵素를 生産할 것이 豫想되어

耐熱性 酵素의 生産, 農産廢棄物處理, 기타 食品加 工등<sup>(5~18)</sup> 여러 方面에 있어 그 利用 可能性에 관 한 관심이 점차 높아져 가고 있다.

따라서 本 研究에서는 耐熱性 amylase源으로 高溫 性 放線菌의 利用性을 檢討하기 위하여 全國 各地 土壤과 堆肥등에 대한 광범위한 分離檢索<sup>(19~22)</sup>을 實施하여 耐熱性  $\alpha$ -amylase生産能이 극히 우수한 菌株를 分離하고 本 菌株에 대한 몇가지 形態學의 性質을 觀察함과 동시에 酵素生産을 위한 培養條 件을 檢討하여 그 結果를 報告하고자 한다.

## 材料 및 方法

### 1. Amylase 生産菌株의 分離

全國各地에서 189個의 土壤試料을 採取하여 table 1 과 같은 分離用 培地를 使用, 常法<sup>(23)</sup>에 따

Table 1. Composition of Isolation Medium

Soluble starch	2.0%
Peptone	1.0 "
Yeast extract	0.5 "
Sodium Chloride	0.5 "
Agar	2.0 "
p. H	7.0

라 50°C에서 稀釋 平板培養을 행한 다음 培地上에 出現한 colony 주위에 N/200 I<sub>2</sub> 溶液을 떨어뜨려 이 때 生成되는 沃度 消失環의 直徑이 9 mm 이상을 나타내는 colony만을 순수분리 하였다.

### 2. 供試菌株

Table 2과 같은 酵素生産의 基礎培地를 使用하여

Table 2. Screening Medium for Enzyme Production.

Soluble Starch	2.0%
Peptone	1.5 "
Yeast extract	0.5 "
NaCl	0.5 "
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 "
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02 "
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.002 "
p. H	7.0

土壤分離菌 128株에 대한 α-amylase生産能을 檢索, 酵素生産能이 극히 우수하였던 G-1011菌株을 供試菌株로 選定 使用하였다.

### 3. 培養方法 및 粗酵素液 調製

酵素生産을 위한 菌培養은 培地 30 ml를 300 ml 용 진탕 flask에 分注, 120°C에서 10분간 加壓殺菌한 다음 土壤分離菌 1白金耳를 接種하고 50°C에서 진탕 培養 (120strokes/min) 하였으며 일정시간 培養한 培養液을 3,000 rpm에서 10분간 遠心分離하여 菌體를 완전히 除去한 上澄液을 粗酵素液으로 使用하였다.

### 4. 供試菌株의 形態觀察

供試菌株로 사용한 G1011菌株의 生理的 및 形態學的 性質의 檢討는 主로 Manual of microbiological method<sup>(24)</sup>에 準해서 行하였다.

### 5. α-amylase 活性測定

粗酵素液의 α-amylase 活性는 blue value法의 改良變法<sup>(25)</sup>을 利用하여 測定하였으며 本 法의 酵素 活性 單位는 基質溶液(10μ/mole glucose 當量/ml의 soluble starch 溶液)의 沃度呈色度를 10 percent 低下시키는 酵素作用量을 1單位(I. D. U)로 表示하였으며 其他의 一般 α-amylase活性 測定法과의 關係는 다음과 같다.

$$10DU = 2.7 DP \text{ (Blue value法)}$$

$$= D_{570}^{1\%} \cdot 0.2 \sim 0.25 \text{ (Wohlgemuth法)}$$

### 6) β-amylase 活性測定

β-amylase活性는 Somogyi變法<sup>(26)</sup>을 利用하여 測定하였으며 酵素活性度는 酵素反應에 의하여 生成된 還元糖量을 glucose로 換算하여 표시하였다.

### 7) 菌體量 測定

培養液의 菌體量은 증류수로 20倍 稀釋하여 610 mμ에서의 optical density로 표시하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 菌株의 分離檢索

전국 각지에서 採取한 189점의 土壤試料에 대하여 稀釋平板培養法에 의한 amylase生産菌의 一次 分離를 행한 結果 Table 3에 표시되어 있는 바와

Table 3 Occurrence of α-Amylase Producing Microorganism in Soils

Soil sample for isolation	Number of samples	Number of isolated
Sewage	22	18
Oil strand	21	8
Cattle manure	26	18
Stream	11	3
Rice field	18	14
Compost	42	46
Hay	23	17
Road	5	1
Ground	14	2
Garden	7	1
Total	189	128

같이 총 分離菌數는 128株이었으며 分離源의 種類에 따른 高溫性 amylase生産菌의 分布는 일반적

으로 堆肥를 비롯한 有機質 腐殖土에 많이 分布되어 있음을 볼 수 있었다.

上記 일차 土壤分離菌 128種을 酵素生産用 基礎培地 30 ml에 接種하고 50°C에서 16 시간 진탕배양하여 각 分離菌株에 대한 粗酵素液을 얻어 blue value 改良變法에 따라 酵素生産能을 檢索하였던 결과 Table 4 와 같이 大多數의 菌株가 1,000 D. U이

Table 4. Distribution of  $\alpha$ -Amylase Activity in 128 Isolates

$\alpha$ -Amylase activity (D. U/ml)	Number of cultures
0~250	5
250~500	28
500~750	85
750~1000	8
1000~1250	1
1250~1500	—
1500~1750	—
1750~2000	—
2000~2250	—
2250~3000	1*

\*The Strain G1011

하의 酵素活性을 나타내었으나 慶州 近郊의 堆肥에서 分離한 G-1011에 菌株는  $\alpha$ -amylase 活性이 다른 分離菌株에 비하여 월등히 우수하였으므로 G-1011 菌株를 본 研究의 供試菌株로 選定하였다.



Fig. 1. Giant Colony of the G-1011 Strain Cultured on the Isolating Medium for 18 hours at 50°C.

## 2. 供試菌株의 同定

供試菌株인 G-1011土壤分離菌의 同定을 위한 基礎試驗으로서 몇가지 形態學的, 生理學的性質을 調査한 결과 Fig. 1 및 2의 giant colony 사진과

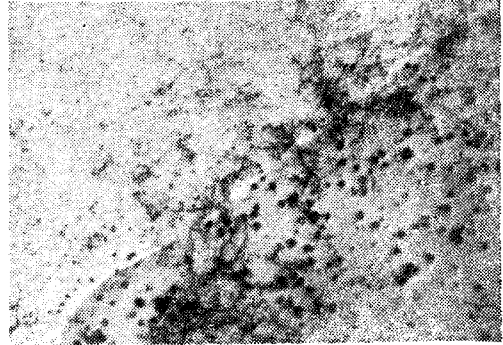


Fig. 2. Photomicrographs of the G-1011 strain grown at 50°C for 14 hours in the Isolating Medium.

agar cylinder法<sup>(27)</sup>에 따라 分離培地를 使用 50°C에서 14 시간 培養한 菌體의 顯微鏡사진에서 나타난 바와 같이 거대한 colony를 形成하고 있으며 colony의 形態는 원형 및 타원형으로서 白色의 氣菌糸로 덮여 있고 氣菌糸와 營養菌糸에는 球型의 分生孢子를 單一로 着生해서 白色의 powdery形態를 나타내고 있다.

또한 본 菌株는 potato, malt extract agar, 合成培地에서 잘 生育하는 好氣性菌이며 生育온도의 범위는 40~60°C이고 水溶性色素를 生産하지 않았다 따라서 G1011 菌株는 高溫性 放線菌에 속하는 菌種임은 확실하나 精確한 同定 結果는 다음 기회에 發表하겠다.

## 3. $\alpha$ -Amylase 生産의 培養條件

### 1) 培養溫度 및 時間

基礎培地 30 ml에 G1011 菌株 1白金耳를 接種하고 培養溫도와 培養時間을 달리한 條件에서 菌體 培養하여 培養溫度 및 시간에 따른 菌體增殖量 (Fig. 3)와  $\alpha$ -amylase 生産量 (Fig. 4)를 調査한 결과 G1011 菌株의 生育溫度 범위는 40°C~60°C이며 最適生育溫度는 50°C이었다.

또한 40°C에서 50°C사이의 培養條件에서는 菌體增殖의 stationary phase에 到達하는데 所要되는 시간이 培養溫度가 높아짐에 따라 比例적으로 短縮되는 特徵을 보여 最適生育溫度인 50°C에서는 培養 12시간 後에서 最大의 增殖量을 나타내었다.

한편 培養溫도와 培養時間에 따른  $\alpha$ -amylase 生産 역시 菌體增殖에 대한 效果와 거의 비슷한 樣相을 나타내어 菌體 增殖의 最適溫度인 50°C에서 16 시간 培養했을 때 最大의 酵素生産量을 보였다.

다음 菌體增殖과  $\alpha$ -amylase 生産의 最適培養溫度

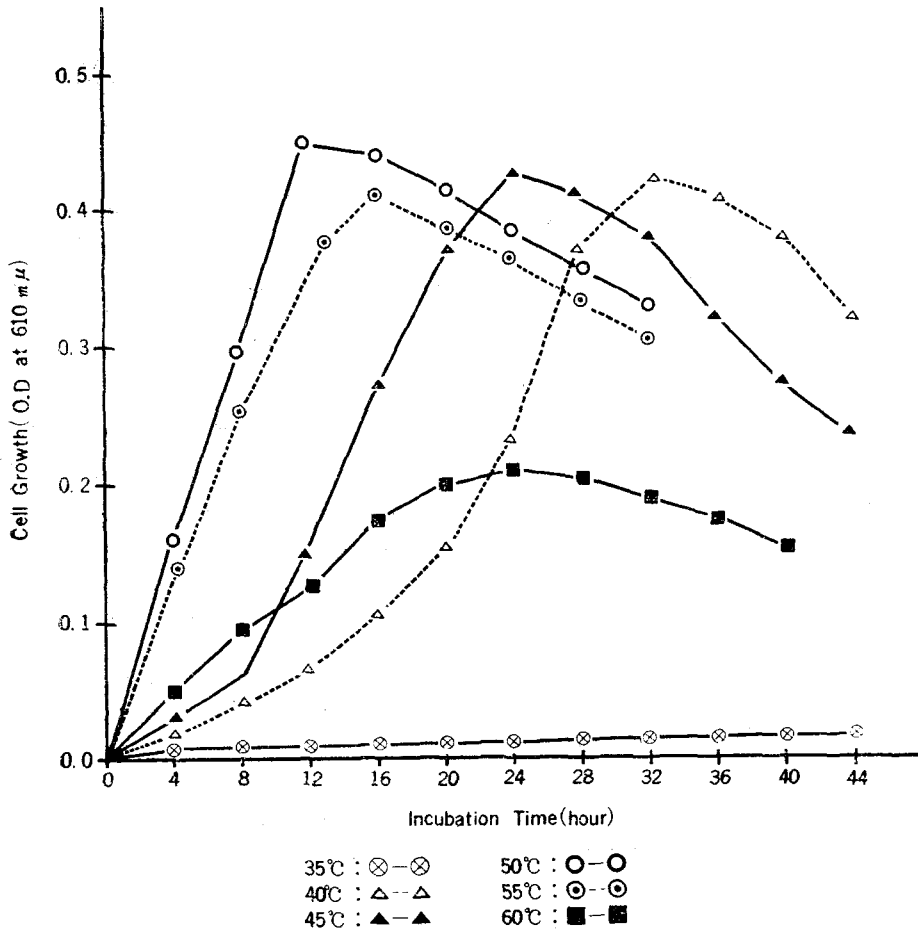


Fig. 3. Change of Cell Growth during Incubation at Various Temperatures

인 50°C에서 G1011菌株을 진탕培養, 培養時間에 따른  $\alpha$ -amylase 生産量을 調査하여  $\beta$ -amylase源으로서 G1011菌株의 利用 可能性을 아울러 檢討하였으나 Fig 5 에 표시된 바와 같이 培養 16시간 전후가 最大로서 210glucose mg/ml의  $\beta$ -amylase 活性을 나타내어 既知의 他 菌株<sup>(28)</sup>에 비하여  $\beta$ -amylase 生産能이 극히 劣等함을 보였다.

따라서 供試菌인 G1011菌株는  $\beta$ -amylase 生産菌으로서는 不適하다고 判定되었다.

## 2) Initial pH의 영향

Acetate buffer (pH 4.0~6.0), phosphate buffer

(pH 0.2~2.6) 및 borate buffer (pH 7.8~7.0) 등을 사용하여 基礎培地の initial pH를 4.0에서 9.0까지 적절히 調整하고 G1011菌株를 接種, 50°C에서 16시간 培養하여  $\alpha$ -amylase 生産에 미치는 培地の initial pH의 效果를 檢討한 結果 (Fig. 6) 菌體增殖과 酵素生産의 最適 initial pH는 7.0이었으며 菌體增殖과 酵素生産에 있어서 G1011菌株는 培地の pH變化에 대하여 극히 敏感한 反應을 나타내고 있음을 볼 수 있었다.

## 3) 炭素源의 영향

酵素生産 基礎培地に Table 5 에 표시된 各種炭

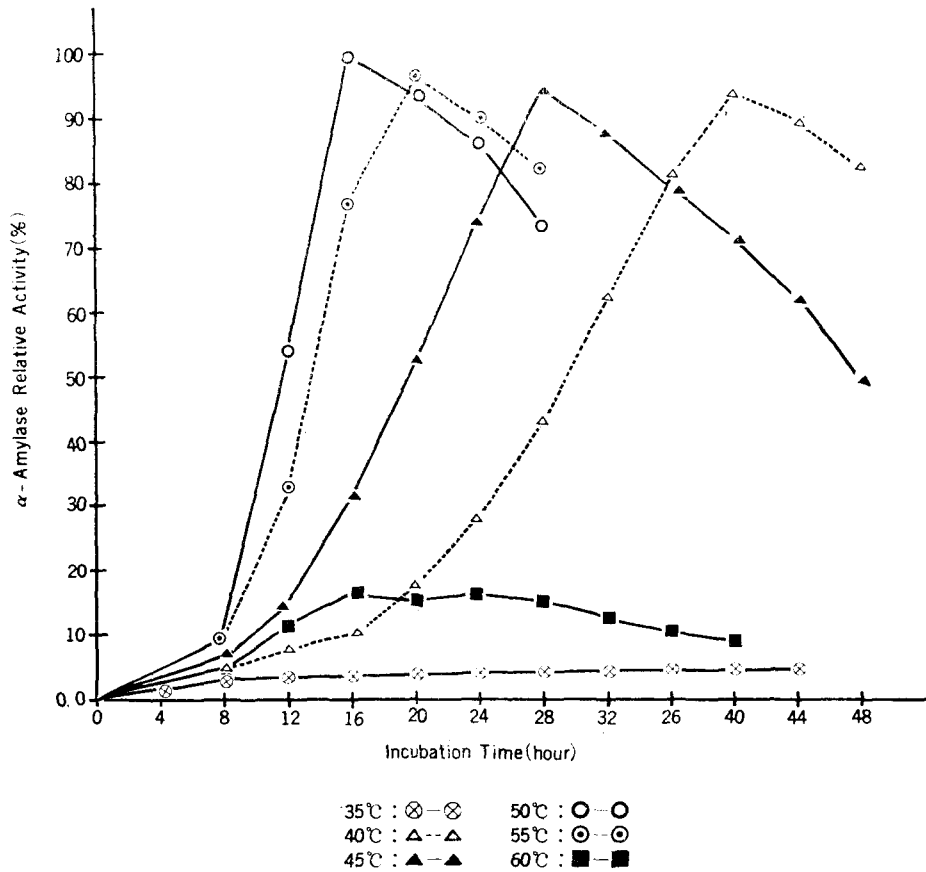


Fig. 4. Effect of Culturing Temperature on  $\alpha$ -Amylase Formation by the Strain G1011

Table 5 Effect of Carbon Source on  $\alpha$ -Amylase Production by the Strain G1011

Carbon source	Cell growth (O.D at 610m $\mu$ )	$\alpha$ -Amylase activity (D. U/ml)
None	—	—
Xylose	—	—
Arabinose	—	—
Glucose	—	—
Gaactose	—	—
Mannose	—	—
Fructose	—	—
Maltose	0.431	626.5

Sucrose	0.214	105.6
Lactose	0.186	141.4
Raffinose	0.287	212.6
Dextrin	0.401	1218.0
Soluble starch	0.370	2121.0
Corn starch	0.362	668.0

炭素源을 2.0% 濃度로 添加하고 50°C에서 16시간 培養하여 各種 炭素源에 의한  $\alpha$ -amylase生産의 誘導效果를 檢討한 結果 G1011菌株는 pentose나 hexose를 막론하고 單糖類 形態의 炭素源 添加時에는 無添加時와 같이 酵素生産은 물론이고 菌體生

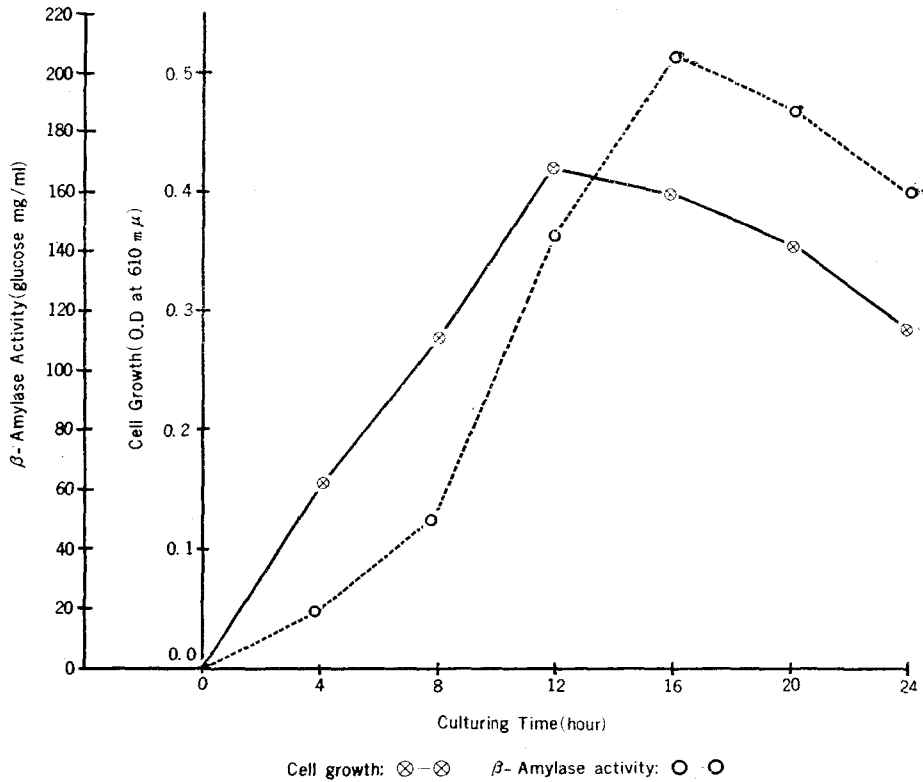


Fig. 5. Production of  $\beta$ -Amylase by the Strain G1011

育이 完全阻害되는 특이한 現象을 나타내어 앞으로 더욱 研究 해볼 課題라고 생각되었다.

한편 菌體增殖은 二糖類인 maltose 添加時 가장 良好한 效果를 나타내고 있는 반면 酵素生産은 多糖類 특히 soluble starch를 添加했을 때 월등한 誘導效果를 보여 maltose添加때에 비하여 약 3 배 이상의 酵素生産량을 나타내었다.

Kuo<sup>5)</sup> 등은 *Thermoactinomyces vulgaris*를 利用한 耐熱性 amylase生産에 관한 研究에서 菌體增殖과 培養液의 pH 變化등에 있어서 soluble starch보다 良好한 效果를 보인 maltose를 培養初에 1.0% 濃度로 添加하고 菌體增殖의 log phase가 끝나는 時點에서 soluble starch 1.0%를 feeding해 줌으로써 酵素生産량을 약 1.3배이상 增加시킬 수 있었다는 報告가 있어 본 研究에서도 培養初에 maltose를 1.0%添加하고 soluble starch의 feeding 시간과

feeding量的 效果를 아울러 討檢해 보았으나 뚜렷한 效果를 얻지 못했다.

#### 4) 窒素源의 영향

炭素源으로 soluble starch 2.0% 窒素源으로서 有機態源은 1.0% 無機態源은 0.2% 濃度로 添加한 基礎培地를 使用하여  $\alpha$ -amylase生産에 미치는 各種 窒素源의 效果를 檢討한 結果 Table 6에서 보는 바와 같이 일반적으로 有機態 窒素源이 無機態 窒素源보다 菌體生育은 多少良好한 結果를 나타내었으나 酵素生産량에 있어서는 뚜렷한 差異를 볼 수 없었다. 그러나 有機態 窒素源中에서 peptone의 添加 경우는 他窒素源에 비하여 酵素生産량이 5 배 내지는 10배 이상으로서 극히 예외적인 현저한 效果를 나타내었다.

#### 5) 培地의 C/N율

G1011 菌株를 利用한  $\alpha$ -amylase 生産에 있어서

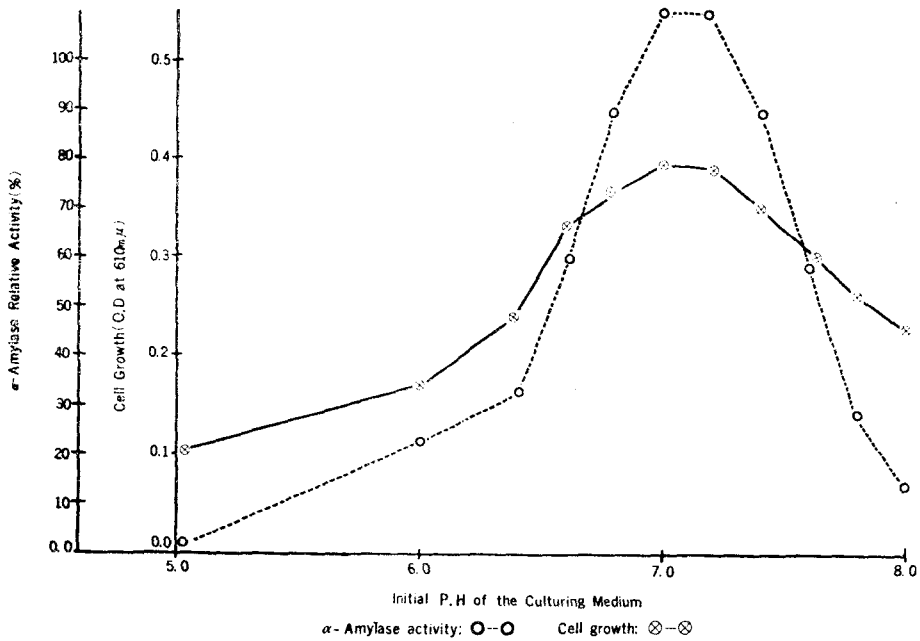


Fig. 6. Effect of Initial P.H. of the Culture Medium on  $\alpha$ -Amylase Formation

Table 6. Effect of Nitrogen Source on  $\alpha$ -Amylase Production by the Strain G1011.

Nitrogen source	Compound	Cell growth (O. D at 610m $\mu$ )	$\alpha$ -amylase activity (D. U/ml)
Organic nitrogen*	Casein	0.380	580.0
	Asparagine	0.290	250.0
	M. S. G.	0.258	508.5
	Peptone	0.376	2444.5
	Urea	0.054	184.6
	C. S. L.	0.325	131.6
	Casamino acid	0.181	606.8
Inorganic nitrogen**	Ammonium sulfate	0.108	456.4
	Ammonium nitrate	0.101	290.6
	Sodium nitrate	0.110	572.6
	Ammonium	0.121	628.5
	Phosphate		
	Potassium nitrate	0.130	728.5
	Sodium nitrite	0.057	101.5
	Cryst		

\*Organic nitrogen : 1.0% added.

\*\*Inorganic nitrogen : 0.2% added.

가장 良好한 效果를 나타내었던 炭素源과 窒素源인 soluble starch와 peptone을 일정비율로 調節한 基

礎培地를 使用하여 酵素生産에 대한 C/N율의 效果를 檢討한 結果 Table 7에 표시된 바와 같이 일

Table 7. Comparison between Carbon Source in Static Cndition

C %	0.5		1.0		2.0		3.0		4.0	
N %	Activity (D. U/ml)	Cell growth (O. D)	Activity (D. U/ml)	Cell growth (O. D)	Activity (D. U/ml)	Cell growth (O. D)	Activity (D. U/ml)	Cell growth (O. D)	Activity (D. U/ml)	Cell growth (O. D)
0.5	194.0	0.102	538.8	0.195	1508.5	0.170	1224.3	0.162	1663.8	0.195
1.0	376.5	0.225	1134.0	0.376	1847.5	0.305	2592.0	0.385	2198.0	0.335
2.0	328.3	0.443	621.5	0.470	2119.0	0.402	1452.5	0.442	1910.0	0.470
3.0	448.8	0.403	730.8	0.454	1196.5	0.422	1410.5	0.445	1624.0	0.464
4.0	919.8	0.447	829.0	0.518	1068.5	0.526	1325.0	0.487	1880.5	0.510

Carbon source : Soluble Starch Nitrogen source : Peptone

반적으로 窒素源의 添加율이 높으면 높을수록 菌體生育은 比例의으로 活潑한 반면 酵素生産은 오히려 低下되는 傾向을 보여 soluble starch 3.0%, peptone 1.0%의 濃度 즉 C/N율이 3:1일 때 酵素生産량이 最大値를 나타내었다.

6) 無機鹽類의 效果

Soluble starch 3.0%, peptone 1.0%의 C/N율을 나타내는 基礎培地에 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 NaCl등의 無機鹽類를 각 濃度別로 添加하여 無機鹽類 添加에 의한 菌體生育과 α-Amylase 生産에 미치는 影響을 調査하였던 바(Table

Table 8. Effect of Inorganic Salt on α-Amylase Production

Inorganic salt	amount of addition (%)	α-amylase act-ivity (D. U/ml)	Cell growth (O. D at 61 0mμ)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00	1776.5	0.351
	0.05	2328.8	0.384
	0.01	2116.4	0.402
	0.02	1805.5	0.326
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.00	1850.2	0.302
	0.01	1940.0	0.310
	0.02	2374.5	0.374
	0.03	2100.0	0.406
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.000	1849.9	0.302
	0.001	1970.8	0.354
	0.002	2290.6	0.487
	0.003	1689.0	0.412
NaCl	0.0	250.0	0.057
	0.1	987.5	0.196
	0.5	2380.4	0.370
	1.0	1672.0	0.274

8) 일반적으로 菌體生育과 酵素生産에 있어서 無機鹽의 添加效果는 뚜렷하였으며 특히 NaCl 경우는 현저한 效果를 나타내어 0.5%濃度로 添加했을 때 는 無添加時보다 9배이상의 酵素生産의 增加를 보였고 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O는 0.05%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02% 그리고 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O는 0.002% 濃度로 添加했을때 각각 가장 良好한 效果를 나타내었다.

7) 菌體增殖 및 酵素生産의 經時的 變化

이상 供試菌인 G1011菌株에 의한 耐熱性 α-amylase 生産에 관한 몇가지 培養條件을 檢討한 결과 Table 9와 같은 組成을 가진 酵素生産 最適培地를

Table 9. Composition of Culturing Medium

Soluble starch	3.0%
Peptone	1.0 "
Yeast extract	0.5 "
NaCl	0.5 "
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 "
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02 "
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.002 "
P. H	7.0

일었으며 培地의 initial pH는 7.0으로 調整하였다.

한편 酵素生産 最適培地 30 ml에 G1011菌株 1 白金耳를 接種, 50°C에서 진탕 培養을 행하여 培養時間에 따른 酵素生産, 菌體增殖, 培養液의 pH變化 및 炭素源인 sluble starch의 消費 등을 調査한 결과 Fig. 7에 표시된 바와 같이 菌體增殖은 培養 4 시간째부터 急激한 增殖을 보여 培養 14시간진 후에서 最大增殖率을 나타내었으며 α-amylase生産 은 培養 16시간 後 즉 菌體增殖의 stationary phase가 거의 끝나는 시기에서 培養液 ml당 酵素活性이 3420 D. U로서 最大生産量을 보였다.



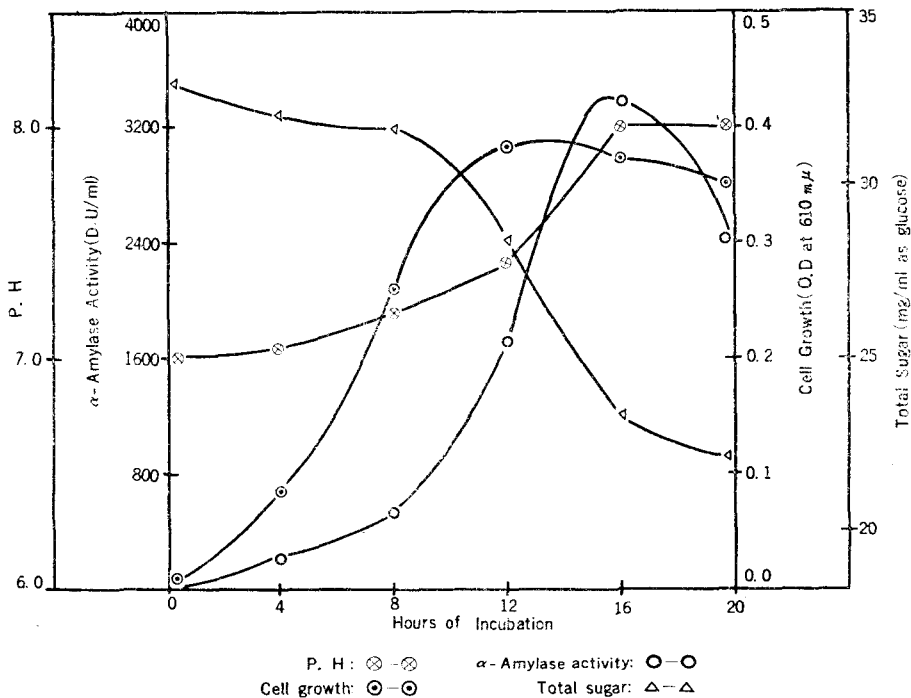


Fig. 7. Change of P.H.,  $\alpha$ -Amylase Activity and Total Sugar Content during Cell Growth

또한 培養液中の total sugar로 표시한 Soluble starch의 培養時間에 따른 變化는 酵素生産이 急激하게 增加되는 培養 8시간부터 16시간사이에서 현저히 消費됨을 보이고 있어 soluble starch의 酵素生産誘導效果를 확인할 수 있었다.

한편 培養液의 pH는 培養開始부터 16시간까지는 다소 높아지는 傾向을 보여 酵素生産이 最大值에 達하는 培養 16시간까지는 8.0이되었으나 이 이후부터는 큰 變動이 없었다.

따라서 培養液의 pH 變化에 敏感한 反應을 보였던 G1011菌株에 의한  $\alpha$ -amylase生産은 培養中 培養液의 pH를 調整해 준다면 酵素生産量이 훨씬 增加되리라 豫想된다.

### 要 約

耐熱性 amylase源으로서 高溫性 放線菌의 利用可能性을 檢討하기 위하여 全國各地의 189點의 土壤試料로부터 128株의 amylase生産菌을 分離하고

이 중에서 耐熱性  $\alpha$ -amylase生産能이 극히 우수한 菌株을 供試菌으로 選定, 本菌株의 形態學的 性質 및 酵素生産을 위한 몇가지 培養條件을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 供試菌인 G1011菌株의 몇가지 生理的 및 形態學的 性質을 觀察한 결과 G1011菌株은 高溫性 放線菌의 一種임을 확인하였다.

2. G1011菌株의 菌體增殖과  $\alpha$ -Amylase生産에 대한 最適培養 溫度는  $50^{\circ}\text{C}$ 이었다.

3.  $\alpha$ -amylase生産의 最適培地 組成은 soluble starch 3.0% peptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.02%, 및  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%,이며 培地의 initial pH는 7.0일때 가장 良好한 結果를 나타내었다.

4. 酵素生産의 最適條件下에서 16시간 진탕 培養하였을때 粗酵素液의  $\alpha$ -amylase 活性이 3420 D.U./ml로서  $\alpha$ -amylase生産量이 最高值를 나타내었다.

## 參 考 文 獻

- (1) Cross, T. J.: *Appl. Bacteriol.*, **31**, 36 (1966).
- (2) Waksman, S. A.: *The Actinomycetes.*, p. 153(1960).
- (3) Pepys, J., Jenkins, P.A., Festenstein, G.N., Gregory, P.H., Lacey M.L. and Skinner, F. A.: *Lancet*, **2**, 607 (1963).
- (4) Tourville, D.R., Weiss, W.I., Werlake, P. T. and Leudeman. G. M.: *Allergy Clin. Immunol.*, **49**, 245 (1972).
- (5) Kuo, M.J. and Hartman, P.A.: *J. Bacteriol.*, **92**, 723 (1966).
- (6) Loginova, L. G., Guzhova, E.P. and Tsaplina, I. A.: *Mikrobiol., Prom. Ref. Sb.*, **2**, 30 (1972).
- (7) Yamagata, K. and Fujita, T.: *J. Fermentation Technology*, **44**, 8, 463 (1966).
- (8) Nizusawa, K., Ichisima, E. and Yoshida, F.: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 884 (1964).
- (9) Suo, M.M., Yasui, Y. and Kobayashi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **45**, 860 (1967).
- (10) Orłowska, B. and Szewczuk, A.: *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **20**, 543 (1972).
- (11) Desai, A.J. and Dhala, S. A.: *J. Bacteriol.*, **100**, 149 (1969).
- (12) Ovcharov, A.K. and Dhala, S. A.: *Appl. Biochem. Microbiol.*, **4**, 373 (1968).
- (13) Desai, A.J. and Dhala, S. A.: *Ant. van Leeuwenhoek*, **33**, 56 (1967).
- (14) Okazaki, H. and Iizuka, H.: *J. G. en. Appl. Microbiol.*, **16**, 537 (1970).
- (15) Stutzenberger, F. J., Kaufman, A. J. and Lossin, R. D.: *Can. J. Microbiol.*, **19**, 553 (1970).
- (16) Fegus, C.L.: *Mycologia*, **61**, 120 (1969)
- (17) Crawford, D.L. and McCoy, E.: *Appl. Microbiol.*, **24**, 150 (1972).
- (18) Agre, N.S., Tatarskaya, R.I., Dembo, G.V. and Pitriuk, A.P.: *Mikrobiologia*, **38**, 1085 (1969).
- (19) Fujii, N., Ockubo, M. and Mikawajiri, H.: *Bull. Fac. Agr. Univ. Miyazaki*, **8**, 320 (1963).
- (20) Tender, M.D. and Burkholder, P.R.: *Appl. Microbiol.*, **9**, 394 (1961).
- (21) Waksman, S. A.: *The actinomycetes*, vol. 2. The William and Wilkins Co., Baltimore (1961).
- (22) Corbaz, R., Gregory, P.H. and Lacey, M. E.: *J. Gen. Microbiol.*, **32**, 449 (1963).
- (23) 食品工學實驗書, 京都大學農學部 食品工學教室 **2**, p. 15 (1970).
- (24) *Manual of Microbiological methods.*, McGraw-Hill Book Co. (1957).
- (25) 山田田洋: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 11. 633 (1963).
- (26) Somogyi, N.: *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 (1945).
- (27) Nishimura, H. and Tawara, K.: *J. Antibiotic*, **10** (Ser, A) 82(1957).
- (28) 山田田洋: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 11. 637 (1963).