

Aspergillus niger KUF-04에 의한 Glucose Oxidase 生産條件에 關한 研究

*崔男熙, *梁鎬錫, **崔塔鎭, 梁漢喆
*(株)鍾根堂, **同德女子大學 食品營養學科,
高麗大學校 食品工學科
(1982년 5월 14일 수리)

Studies on the Conditions of Glucose Oxidase Production by *Aspergillus niger* KUF-04

Nam-Hee Choi,* Ho-Suk Yang,* Yong-Jin Choi** and Han-Chul Yang

Chong Kun Dang Corporation,*

Dept. of Food and Nutrition, Dong Duck Woman's College,**

Dept. of Food Technology, Korea University, Seoul, Korea

(Received May 14, 1982)

Abstract

To maximize the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* KUF-04 isolated from a soil, the cultivation conditions and nutrient sources for the enzyme production were studied. The results obtained were as follows:

1. The optimum temperature, pH of the medium, and cultivation time for the enzyme formation were found to be 28-34°C, 7.0-8.0 and 40 hours, respectively.
2. The best carbon source was proved to be glucose and its most effective concentration was 15 percent.
3. Ammonium sulfate was the best nitrogen source as compared with the other inorganic and organic nitrogen sources tested. Its optimum concentration for the glucose oxidase production was 0.02 percent.
4. As mineral sources, 0.05% of Magnesium sulfate 7-hydrate and 0.02% of Potassium phosphate, monobasic seemed to be necessary to further increase the level of the enzyme production.

序 論

1904年 Maximow는 *Aspergillus niger*의 菌體粉碎法을 發表하였으며 그는 菌體를 Acetone으로 처리하여 얻은 沈澱物이 酸化酵素임을 밝혀냈다.¹⁾ 한편 Müller는 1928年 *Aspergillus niger*가 分泌하는 酵素가 포도당을 酸化시킨다는 事實을 發見하였으며²⁻⁴⁾ 이어 *Penicillium glaucum*에서도 同一酵素를 發見하여 이 酵素의 生産 및 性質에 關한 研究를 報告하였고 이 酵

素를 처음으로 glucose oxidase (β -D-glucose; O₂ Oxidoreductase, EC 1. 1. 3. 4.)로 命名하였다.⁵⁻⁶⁾

Franke 등은 *Aspergillus niger*를 利用, 高純度の glucose oxidase를 製造하여 포도당을 基質로 했을때 gluconic acid와 H₂O₂가 生成됨을 밝혀냈으며,⁷⁻¹⁴⁾ Kusai 등은 이온교환 수지를 使用하여 *Penicillium amagasakiense*가 生産한 glucose oxidase를 結晶化하는데 成功하였다.²⁰⁾

한편 1970年代에 들어와서 酵素固定化方法이

急速으로 發展됨에 따라 glucose oxidase를 固定化시켜 gluconic acid를 연속적으로 生産하는 方法이 開發利用되고 있다. ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ glucose oxidase는 *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucum*, *Aspergillus oryzae*,⁽¹⁸⁾ *Penicillium notatum*,⁽¹⁹⁾ *Penicillium amagasakiense*,⁽²⁰⁾ bacteria,⁽²¹⁾ 등의 微生物과 효소류,⁽²²⁾ 감귤류⁽²³⁾ 및 벌꿀⁽²⁴⁾ 등에서 널리 發見되고 있다.

Glucose oxidase는 1952年 처음으로 商品화된 이래 乾燥달걀 製造時 포도당을 除去目的으로 使用되고 있으며,⁽²⁵⁾ 맥주 및 각종 包裝乾燥食品의 酸素除去用으로도 널리 使用되고 있다.⁽²⁶⁻²⁷⁾ 또한 glucose oxidase는 포도당 定량에도 利用되고 있을 뿐만 아니라,⁽²⁸⁾ 醱酵工業에서는 醱酵槽의 通氣容量측정에 유용하게 이용되고 있는 등⁽²⁹⁾ 그 利用範圍가 날로 확대되고 있다. 따라서 著者⁽³⁰⁾ 등은 glucose oxidase 生産能力이 우수한 菌株을 土壤에서 分離, 同定하고 이 分離菌에 의한 glucose oxidase 生産을 目的으로 分離菌의 培養條件 및 營養物에 對하여 研究한 바를 報告한다.

實驗材料 및 方法

菌株

Yang 등⁽³⁰⁾에 의하여 分離, 同定된 *Aspergillus niger* KUF-04를 使用 하였다.

Table 1. Composition of the Medium for Slant Culture

Composition	Quantity
Glucose (crystal)	30.0g
NaN ₃	3.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
FeSO ₄	0.18g
K ₂ HPO ₄	1.0g
KCl	0.5g
Agar	15.0g
Distilled water	1000ml

pH : 5.5 ± 0.1

培地

菌株의 保存用 培地組成은 Table 1과 같으며 前培養 및 本培養培地の 組成은 各各 Table 2 및 Table 3과 같다.

試藥

Peroxidase는 Wako Pure Chemice社製, 3·3'-1,2,3, Dimethoxybenzidine (o-dianisidine)은 Kanto Chemical社製였으며 기타는 一級試藥을 使用하였다.

Table 2. Composition of the Medium for Pre-Culture

Composition	Quantity
Glucose (crystal)	30.0g
Corn Steep Liqior (50%W/W)	20.0g
NH ₄ Cl	9.0g
KH ₂ PO ₄	2.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0g
CaCO ₃	10.0g
Distilled water	1000ml

pH : 6.6 ± 0.1

培養條件

前培養 : Table 2와 같은 組成의 培養液 100 ml씩을 500 ml baffle flask에 注入 하여 121°C에서 20分 殺菌한 後 Table 4에 表示한 培養條件에서 培養하였다.

本培養 : Table 3과 같은 組成의 培地液 125 ml를 500 ml baffle flask에 注入 121°C에서 20分 殺菌하여 Table 4에 表示한 條件으로 培養하였다.

乾燥菌體量 : 培養液 一定量을 3000 rpm 에서 15分間 遠心分離하여 上澄液을 除去시킨 後 0.1 N Hcl로 3回 反覆洗滌하여 CaCO₃ 등을 除去하고 증류수로 3回 洗滌濾過하여 105°C에서 恒量이 될 때까지 乾燥한 後 秤量하였다.⁽³¹⁾

糖 定量 : Shaffer-Somogi micromethod에 준하여 培養液中的 糖을 定量하였다.⁽³²⁾

Table 3. Composition of the Basal Medium for Main Culture

Composition	Quantity
Glucose (crystal)	100.0g
KH ₂ PO ₄	0.2g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2g
CaCO ₃	35.0g
Distilled water	1000ml

pH : 7.2 ± 0.1

Glucose Oxidase 力價測定

酵素力價는 Schepartz와 Subers 등⁽³³⁾의 變法 (Fig. 1 참조)을 利用, 測定하였으며, 既知濃度의 H₂O₂를 利用 Fig. 2와 같은 標準曲線을 얻었다. 粗酵素液은 培養液과 0.2M 인산나트륨완충액을 各各 3 ml씩 50 ml beaker에 取하여 Tomy seiko (Japan, UR-200P)社製 超音粉碎機를 利用, 5℃ 이하에서 45w 로 10分間 細胞를 粉碎한 다음 緩衝液으로 稀釋濾過하여 使用하였다.

結果 및 考察

前培養時間의 影響

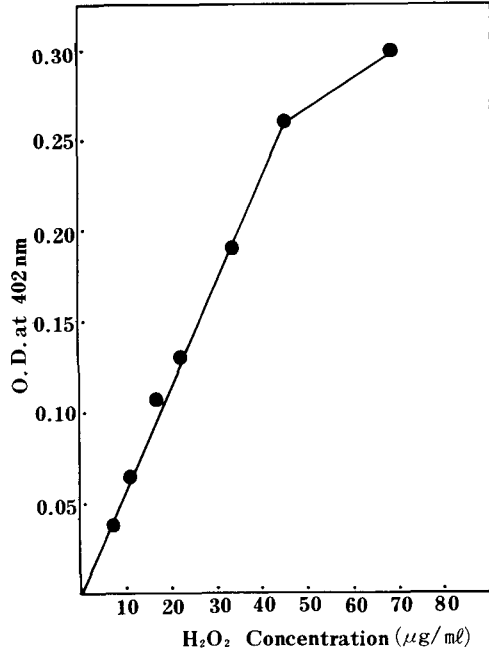


Fig. 2. Standard Curve for H₂O₂ Determination by the Method of Schepartz and Subers⁽³³⁾

本 培養의 seed culture로 使用할 前培養液의 培養時間에 따른 菌體增殖과 glucose oxidase 生産量등을 조사한 결과 Fig. 3에 表示된 바와 같이 前培養時間이 25時間進후이였을 때에 菌體增殖과 더불어 酵素生産이 가장 良好하였으며 20時間以前 培養液을 seed culture로 使用했을시

Fig. 1. Analytical Method of Glucose Oxidase.

<p>Principle : $C_6H_{12}O_6 + H_2O + O_2 \xrightarrow{GOD} C_6H_{12}O_7 + H_2O_2$</p> <p style="text-align: center;">$H_2O_2 + O-Dianisidine \xrightarrow{POD} O-Dianisidine + H_2O$</p>
<p>Procedure :</p> <ul style="list-style-type: none"> 1.5ml Glucose Solution (10% Glucose in Buffer pH 6.1) 1.8ml phosphate Buffer pH 6.1 P 0.1 ml O-Dianisidine (3.5mg/ml in 95% Ethanol) 50 μl of Peroxidase (0.04mg/ml in Buffer pH 6.1) 50 μl of Sample Incubation for 5 minutes (inactivation) ctiv 20 μl of Conc-HCl Incubation for 15 minutes at 37°C 20 μl of Conc-HCl Boiling for 5 minutes (inactivation) Absorbance at 492 nm 0

Table 4. Culture Conditions for Pre and Main-Cultures

Condition	Culture	Pre-Culture	Main-Culture
Medium		for Pre-Culture	for Main-Culture
Container		500 ml flask	500 ml flask
Charge Vol.		100 ml	125 ml
Inoculum size		1% (suspended spore)	5%
Shaker Type		Rotary	Rotary
Agitation (rpm)		240	240
Culture Time (hr)	22-26		40-42
Cultivating Temp.		28°C	28°C

는 菌體增殖量이 급격히 감소하였고 糖消費量 역시 減少되었다. 結果적으로 活性이 좋은 對數 末期의 菌을 接種, 培養할 때 glucose oxidase 生産이 가장 良好한 것으로 思慮된다.

本培養時間의 影響

醱酵時間에 따른 酵素生産量을 研究한 結果

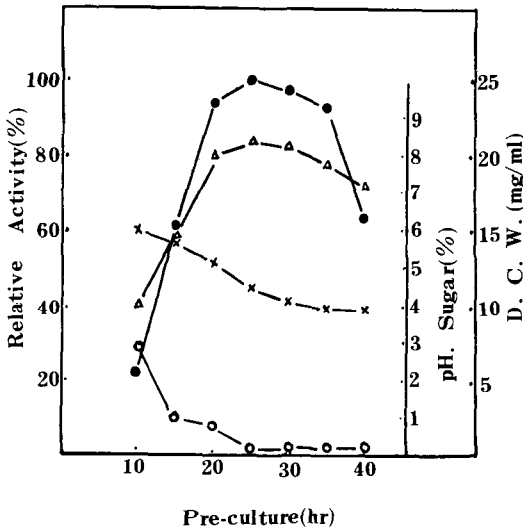


Fig. 3. Effect of Pre-Culture Time on the Glucose Oxidase Production.

- : Relative Activity
- ×— : Residual Sugar
- △— : Dry Cell Weight

(Fig. 4) 培養 20時間부터 菌增殖과 酵素生産이 急激하게 增加되어 40時間진후에서 最大活性을 나타내었고 그 以後부터는 현저히 감소됨을 보였다. pH의 강하 및 糖消費速度는 菌體增殖과 더불어 급격히 降低되었으나 정지기에서는 큰 變化가 없었다. Yang 등⁽³⁰⁾에 依하면 *Asp. niger* 를 使用하여 gluconic acid를 生産할 때 培養 40時間以後에도 gluconic acid 生産이 增加하였다 하나 本試驗에서 40時間以後 酵素活性이 減少함은 酵素安定性에 관계가 있는것으로 생각된다.

接種量의 影響

最大經濟收率을 내는 最適 接種量을 決定하기 爲해 本培養液의 2.5~20% (v/v)에 해당하는 量을 各各 接種하여 28°C에서 42時間 震盪培養한 結果(Fig. 5) 5~10% 接種하였을 때 最大酵素活性을 나타내었다.

특히 5% (v/v) 以下の 接種量에서는 菌體量과 酵素活性의 현저한 減소를 보였다.

Heding⁽³¹⁾의 報告에 依하면 glucose oxidase 발효 生産을 爲한 最適 接種量은 6% (v/v) 였다 고하며 Mahmoud 등⁽³⁵⁾은 gluconic acid 醱酵에서 接種量이 10% (v/v) 以上일 때는 酵素活性의 低下 現象을 나타냈는데 이는 細胞가 lysis로 인해 파괴되는 동시에 酵素가 pH등의 影響을 받아 失活되기 때문인 것으로 믿어진다.

培養溫도의 影響

20~40℃ 내의 相異한 培養溫度에서 40時間 培養하여 酵素生産에 미치는 溫도의 影響을 비교 검토한 결과 Fig. 6에 表示되어 있는 바와같이 28~34℃에서 가장 높은 酵素活性을 나타냈으며 40℃에서는 酵素活性이 多少 低下됨을 보였다. 이에 반하여 28℃以下의 培養溫度에서는 酵素生産이 극히 低조함을 보였다. 以上の 結果는 最適溫度以下의 培養溫度에서는 菌體增殖不良과 더불어 酵素蓄積이 적은데 연유하는 反面 最適溫度以上의 溫度에서는 酵素의 失活이 촉진되는 데 기인되는 것으로 생각된다.

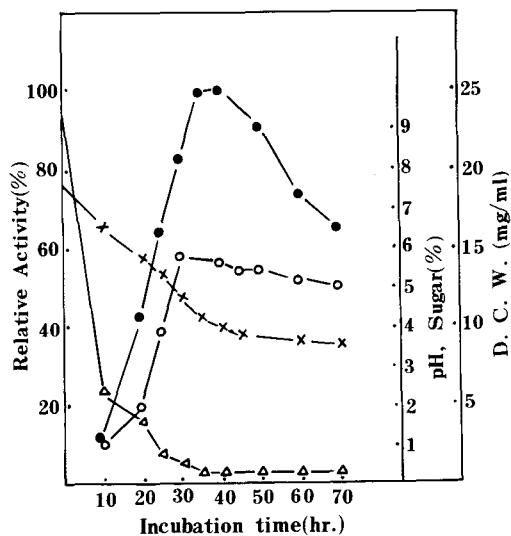


Fig. 4. Time Course of Glucose Oxidase Production by *Aspergillus niger* KUF-04.

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- △— : Residual Sugar
- : Dry Cell Weight

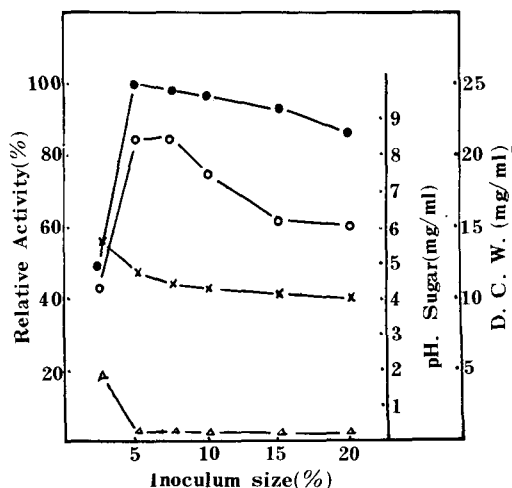


Fig. 5. Effect of Inoculum Size on the Glucose Oxidase Production by *Aspergillus niger* KUF-04

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- : Dry Cell Weight
- △— : Residual Sugar

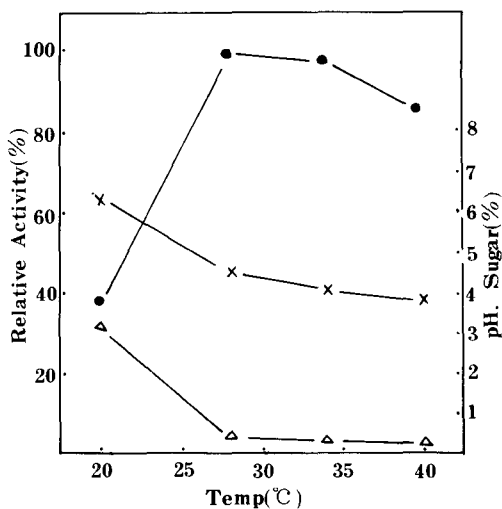


Fig. 6. Effect of Temperature on the Glucose Oxidase Production by *Aspergillus niger* KUF-04.

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- △— : Residual Sugar

培地の pH 影響

殺菌前 培地pH를 40~10.0範圍로 調節하여 培地の 初期pH가 酵素生産에 미치는 影響을 조사한 結果 pH7.0~8.0에서 菌體增殖과 더불어 最大活性을 나타냈으며 一般的으로 酵素生産은 培地pH에 매우 민감한 反應을 보였으며 特히 酸性쪽의 pH에서는 酵素生産은 勿論 菌體增殖

도 현저히 阻害됨을 볼 수 있었다. 또한 培地의 初期pH가 4.0이었을 때는 황색색소의 생성을 동반하였다(Fig. 7). 이와 같은 結果는 Bruno 등³⁶⁾과 Heding³⁴⁾의 研究結果와 잘 一致된다.

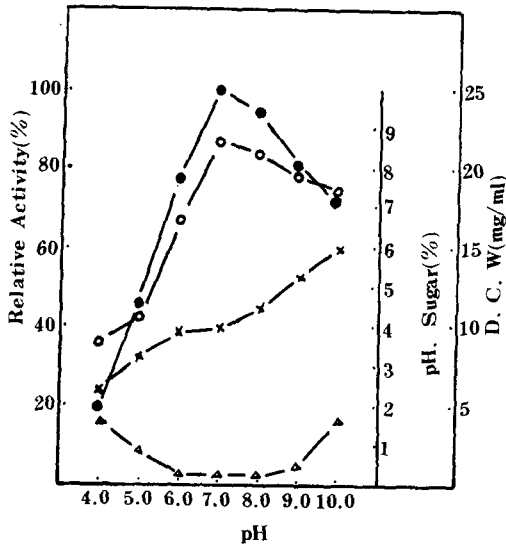


Fig. 7. Effect of Initial pH of Media on the Production of Glucose Oxidase.

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- △— : Residual Sugar
- : Dry Cell Weight

通氣의 影響

通氣量이 酵素生産에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 培養液을 30~250 ml까지 注入하여 28°C에서 40時間 培養한 結果 Fig. 8에서 보는 바와 같이 125ml를 注入하였을 때 菌體增殖과 酵素活性이 가장 높았다. Nakamatsu 등³⁸⁾은 *Penicillium purrogenum*과 *Penicillium chrysogenum*을 使用하여 같은 실험을 한 結果 500ml flask에 각각 30ml와 100ml씩의 培地를 注入, 培養했을 때 最高의 酵素活性을 나타냈다 한다. 이에 反해 200ml以上 注入 培養時는 酵素活性이 급격히 減少했으며 糖消費速度도 느리고 배양액의 최종 pH도 높은 現象을 나타냈다.

이와같은 結果는 通氣量 부족으로 菌體增殖이 不良한데 原因이 있는 것으로 思慮된다.

炭素源의 影響

Table 3에 表示한 기본培地에 各種 炭素源을 10% (w/v) 씩 첨가하여 28°C에서 40時間 培養, 各 炭素源의 影響을 관찰한 結果 Table 5에 나타낸 바와 같이 glucose) sucrose) fruc Fose 순으로 높은 酵素活性을 나타냈으며 또한 Fig. 9에서 보는 바와 같이 glucose 濃度가 15% (w/v) 일때 가장 높은 酵素活性을 나타냈다. Franke 등³⁷⁾은 포도당을 30% 첨가 했을때 最大의 酵素活性을 나타내었다고 하며 또한 Kusai 등³⁹⁾은 *Penicillium amagusakiense*에 의한 glucose oxidase 生産은 炭素源으로서 포도당보다 서당이 더욱 效果의 이라고 하였다. 따라서 炭素源의 效果에 있어서 差異가 인정되었다.

窒素源의 影響

有機窒素와 無機窒素源을 各各 0.05%와 42 ml-N/l 를 첨가하여 28°C에서 40時間 培養하여 glucose oxidase 生産에 미치는 窒素源의 影響을 檢討한 結果 Table 6에 表示된 바와 같이 無機窒素源은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 순으

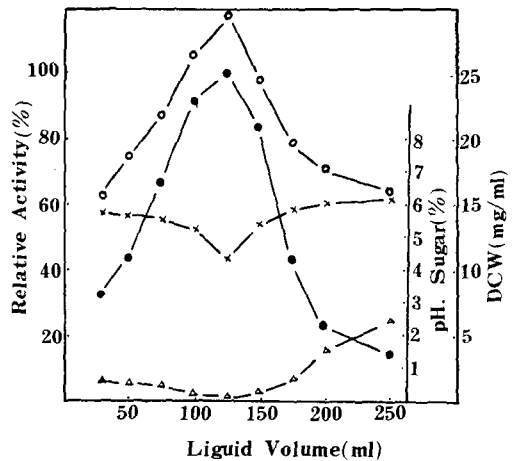


Fig. 8. Effect of Liquid Volume on the Production of the Glucose Oxidase.

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- △— : Residual Sugar
- : Dry Cell Weight

Table 5. Effect of Carbon Sources on the Production of Glucose Oxidase

Carbon Source	Final pH	Residual Sugar (%)	Activity (unit/ml)	Relative Activity (%)
Galactose	6.80	6.72	959	27.3
Glucose	4.35	0.42	3514	100.0
Fructose	6.10	6.35	1493	42.5
Sucrose	5.42	1.72	2609	74.2
Lactose	6.35	6.27	887	25.3
Maltose	6.15	6.82	1054	30.0
Cellobiose	6.01	6.45	671	19.1
Corn starch	5.50	6.35	351	10.0
Dextrin	5.70	5.21	938	26.7
Potato starch	6.70	6.52	175	5.0

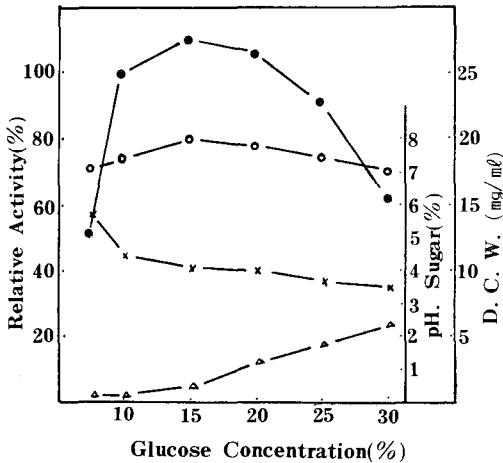


Fig. 9. Effect of Glucose Concentration on the Glucose Oxidase Production.

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- △— : Residual Sugar
- : Dry Cell Weight

로 良好했으며 有機窒素源은 無機窒素源보다 全般적으로 低調한 効果를 보였다. 한편 Nakamatsu 등³²⁾은 窒素源으로서 요소를 첨가하여 가장 良好한 結果를 얻었다고 報告하고 있어 本實驗의 結果와 相異함을 보였다. Fig. 10은 酵素活性이 가장 良好한 $(NH_4)_2SO_4$ 의 最適濃度에 對한 結果로서 $(NH_4)_2SO_4$ 를 0.02% 첨가했을 때

가장 良好하였음은 0.05%를 첨가한 Su 등³³⁾의 結果와 一致하지 않았다.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 影響

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 最適濃度는 Fig. 11에 表示되어 있는 바와 같이 0.05%였고 그 以上 첨가

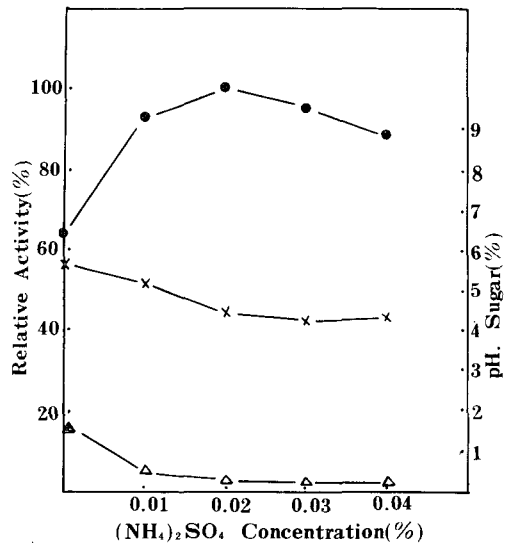


Fig. 10. Effect of Ammonium Sulfate Concentration on the Glucose Oxidase Production.

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- △— : Residual Sugar

하여도 pH變化나 糖消費에 큰 差異가 인정되지 않았음은 微量의 Mg^{++} 이온첨가만으로 糖대사촉진에 충분한 것으로 생각된다.

CaCO₃ 및 KH₂PO₄의 影響

pH調節의 機能을 가진 CaCO₃의 最適濃度를 檢討하기 위해 0~4.5%까지 CaCO₃를 첨가,

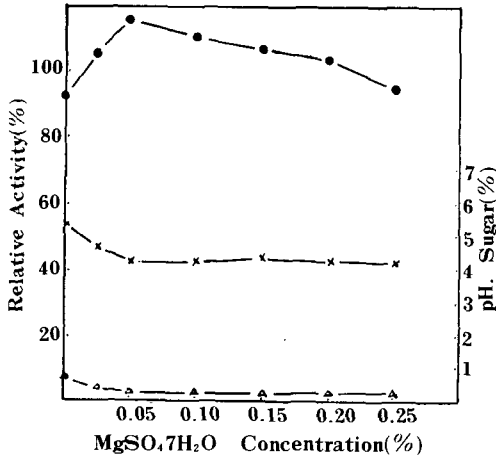


Fig. 11. Effect of MgSO₄·7H₂O Concentration

on the Glucose Oxidase Production,

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- △— : Residual Sugar
- : Dry Cell Weight

28°C에서 42時間 培養한 結果(Fig. 12) CaCO₃ 첨가량이 3.5%까지 增加함에 따라 菌體增殖과 더불어 酵素活性의 增加를 보였다. 反面 첨가하지 않았을 때는 最終pH가 2.0부근까지 떨어짐과 同時에 菌體增殖 역시 현저한 阻害와 더불어 黄色色素生産을 동반하였다. CaCO₃첨가량이 最適濃度以下일 때는 gluconic acid生産량이 增加되고 따라서 培養液의 pH가 酸性化된디이 結果 酵素의 力價失活이 增加함은 물론 菌體成長에도 阻害를 주게 되는 것으로 思慮된다

또한 KH₂PO₄가 酵素生産에 미치는 影響을 조사하기 위해 KH₂PO₄를 0~0.05%까지 첨가하여 28°C에서 40時間 震盪培養한 結果(Fig. 13) 0.02% 첨가시 最大酵素活性을 나타냈다. 한편 Nakamatsu 등³⁸⁾에 의하면 0.2% 첨가 하였을 때 最大活性을 나타냈다 하나 本菌株의 경우

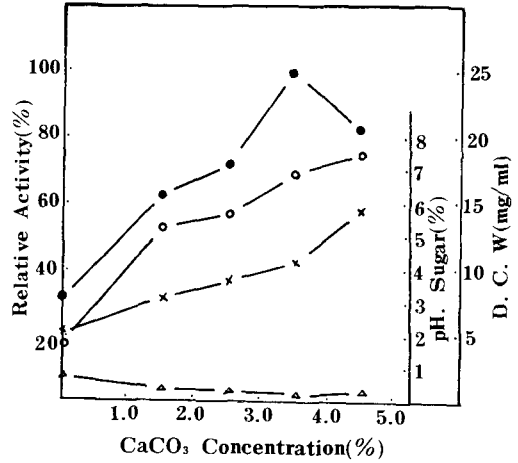


Fig. 12. Effect of CaCO₃ Concentration on the Glucose Oxidase Production

- : Relative Activity tivit
- ×— : Final pH
- : Dry Cell Weight
- △— : Residual Sugar

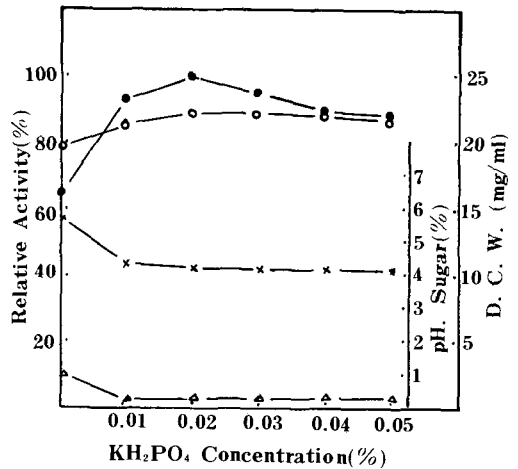


Fig. 13. Effect of KH₂PO₄ Concentration on the Glucose Oxidase Production.

- : Relative Activity
- ×— : Final pH
- △— : Residual Sugar
- : Dry Cell Weight

1/10의 인산농도에서도 酵素生産은 물론 菌體增殖 내지는 糖 利用率에 전혀 지장이 없는 것으로 나타났다.

要 約

土壌에서 분리 同定된 *Aspergillus niger* KU K-04에 의한 glucose oxidase 生産을 最大化하기 위하여 효소생산에 미치는 培養條件 및 營養源에 對하여 研究하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 酵素生成을 위한 最適培養溫度, 培地pH 및 培養時間은 各各 28~34°C, 7.0~8.0 및 40 時間이었다.

2. 炭素源으로서는 포도당이 가장 良好하였으며 最適濃度は 15% (w/v)이었다.

3. (NH₄)₂SO₄가 窒素源으로서 가장 좋은 酵素活性을 나타냈으며 酵素生産을 위한 最適濃度は 0.02%이었다.

4. 무기염으로서는 MgSO₄ · 7H₂O 및 KH₂PO₄를 各各 0.05%와 0.02%를 첨가했을 때 酵素生産이 增加되었다.

참 고 문 헌

- 1) Gerald, Reed : *Enzymes in food processing*, Academic press, New York, 222 (1975).
- 2) Müller, D. : *Biochem. Z.*, **199**, 136 (1928).
- 3) Müller, D. : *Biochem. Z.*, **313**, 211 (1929).
- 4) Müller, D. : *Biochem. Z.*, **232**, 423 (1931).
- 5) Müller, D. : *Erob. Enzymforsch.* **5**, 259 2 (1936).
- 6) Müller, D. : *Enzymologia.* **10**, 40 (1941).
- 7) Franke, W. and F. Lorenz : *Ann.*, **542**, 1 (1937).
- 8) Franke, W. and F. Lorenz : *Ann.*, **541**, 117 (1939).
- 9) Franke, W. and F. Lorenz : *Ann.*, **555**, 111 (1944).
- 10) Franke, W. and F. Lorenz : *Ann.*, **559**, 199 (1948).
- 11) Keilin, D. and E. F. Hartree : *Biochem. J.*, **50**, 331 (1952).
- 12) Keilin, D. and E. F. Hartree : *Biochem. J.*, **50**, 341 (1952).
- 13) Underkofler, L. A. : *Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem.*, Tokyo-Kyoto, 486 (1958).
- 14) Kusai, K., I., Sekuzu, B. Hagihara, K. Okunaki, S. Yamauchi, and M. Nakai : *Biochem. Biophys. Acta* **40**, 555 (1960).
- 15) Miyamura, M. and S. Suzuki : *Nippon Kagaku Kaishi*(Japan), **7**, 1274 (1972).
- 16) Herring, W. M., R. L. Laurence, and J. R. Kittrell : *Biotech. Bioeng.*, **14**, 159 (1974).
- 17) Kapoulas, H. A., R. Korus, and K. Driscoll O : *Biotech. Bioeng.*, **16**, 159 (1974).
- 18) Ogura, Y. : *Acta Phytochim.* **11**, 127 (1939).
- 19) Coulthard, C. E., R. Michaelis, W. F. Short, G. Sykes, G. E. H., Skrimshire, A. F. B. Standfast, J. H. Birkinshaw, and H. Raistrick : *Nature* (Lond.) **150**, 634 (1942).
- 20) KUSAI, K. : *Ann. Rept. Sci. Works, Fac. Sci., Osaka Univ.*, **8**, 43 (1960).
- 21) Dowling, J. H. and H. B. Levine : *Bacteriol.*, **72**, 555 (1956).
- 22) Bean, R. C. and W. Z. Hassid : *J. Biol. Chem.*, **236**, 1235 (1961).
- 22) Bean, R. C. and W. Z. Hassid : *J. Biol. Chem.*, **236**, 1235 (1961).
- 23) Bean, R. C. and W. Z. Hassid : *J. Biol. Chem.*, **218**, 425 (1956).
- 24) Gauhe, A. S. Vergleich : *Physiol.*, **28**, 211 (1941).
- 25) Baldwin, R. B., H. A. Campbell, B. Thiessen, and G. J. Lorant : *Food Technol* **7**, 275 (1953).
- 26) Barton, R. R. S. S. Rennert, and L. A. Underkofler : *Food Eng.*, **27**, No. 12, 79 (1955).
- 27) Zambito, A. T. : *Food Ind.* **21**, 1554 (1949).
- 28) Keilin et al, *Biochem. J.*, **42**, 230 (1948)
- 29) Linek, V., P. Benes, F. Hovorka and O. Holecek : *Biotech. Bioeng.*, **23**, 1467-1484 (1981).
- 30) Yan, H. S., Dong-Hoon Kim and Han-Chul Yang : *J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **8**, 93 (1980).

- 31) Carlile, M. J. : *Method in Microbiology*, Vol 4 Academic Press, New York, 252 (1971).
- 32) Holwitz, W. : *Method of Analysis of A. O. A.* : L, Washinton D. C 5 15 (1980).
- 33) Schepartz, Abner I. and Mary H. Hubers : *Biochim, Biophys. Acta*, **85**, 228-237 (1964).
- 34) Heding L. Dan : *Kemi* **47**, (6), 61-3 (1966) (Dan).
- 35) Mahmoud, S. A. S, El-Sawy M. and Nous El-Din I. Brahim O. O. : *Egypt. J. Food Sci.*, **5**, pp. 9-21 (1977).
- 36) Bruno, D. and H. Samlla : *Brannt Wein wirtshaff* **109**, 21-7 (Ger) (1969).
- 37) Frankg W., G. Eichorn. L. Moechel, and I. Bertram : *Arch. Mikrobiol.* **46**, 96-116 (1964) (Ger).
- 38) Nakamatsu, T., T. Akamatsu. R. Miyajima, akd I. Shiio : *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1803 (1975).
- 39) Su. Yuan-Chi Wen-Hsiug Liu, Lih-Yun Jang : *Pro. Natl. Sci. Counc, Part 2* (Taiwan) **10**, 143-60 (1977).