

## *Aspergillus flavus*의 強力 Protease生成 突然變異의 誘發\*

李 永 祿 · 朴 龍 根 · 高 尙 均

(高麗大學校 生物學科)

### On a highly proteolytic mutant strain of *Aspergillus flavus*

Lee, Y.N., Y.K. Park and S.K. Koh.

(Dept. of Biology, Korea Univ.)

#### ABSTRACT

Mutational experiments were performed to improve the protease productivity of *Aspergillus flavus* KU 153, which is selected among the wild strains. A UV-induced mutant strain having high protease productivity was obtained by the use of the clear zone method as a simple criterion for a primary screening test. Neutral and alkaline protease activities of the mutant strain were higher than 1.8 times, compared with those of the parental strain, respectively, while in the case of acid protease, it was 2.7 times. The mutant strain selected was more powerful in the production of cellulase and amylase, as well as protease in wheat bran, compared with those of the parental strain. Protease production of the parental strain has reached maximum level at 3 days culture, while alkaline and neutral protease production of the mutant strain has reached at 2 days culture.

On the other hand, the mutant strain formed the spore slowly, compared with the parental strain. Column chromatography of the neutral protease on DEAE-Sephadex A-50 showed that the mutant strain was not induced the formation of another neutral protease isozyme, but induced the variation in the function of regulatory gene.

#### 緒 論

酵素 또는 醱酵產物의 生成을 높이기 위해 紫外線, X-線, 감마線 또는 化學物質等 여러가지 mutagen을 處理하여 糸狀菌의 突然變異를 誘發시키려는 많은 노력이 있었다. 糸狀菌의 人工突然變異에 관한 研究로는 紫外線에 의한 Maxwell (1952), Iguchi(1955), Lee and Chang(1965), Ishiie(1966) 등의 研究와 감마線에 의한 Han(1977)의 研究, 그리고 high energy electron에 의한

Mandels *et. al.*(1971)의 *Trichoderma viride*에 관한 研究等이 있다. 이들은 모두 突然變異에 의해 酵素 또는 醱酵產物들의 生成이 增加됨을 報告하였다. Iguchi(1955)는 protease生成能이 우수한 突然變異株를 選別하기 위해 Casein培地를 使用하였고 Sekine *et. al.*(1969)은 casein agar medium上에서 clear zone과 colony의 직경의 比(HC-ratio)가 alkaline protease activity와 相關關係가 있다고 報告하였다. 그러나 이들 突然變異株의 遺傳의 特性이나 그 生成機作에 關해서 는 깊이 研究되지 않고 있다. 또한 酵素의 生成

\* 이 論文은 峨山社會福祉事業財團의 支援을 받았다.

能은 같은 種에 있어서도 菌株에 따라 다르며 또한 生態的 要因에 따라서도 큰 差異가 있다.

本研究에서는 우리나라 自然環境에서 분리한 *Aspergillus* 菌株로 부터 가장 優秀한 protease 生成能을 가지는 野生菌株을 選別하고, 이로부터 突然變異를 誘發시켜 더욱 強力한 protease 生成能을 가지는 變異株를 選別하고 그 突然變異株의 遺傳學的 特性을 밝히고저 一聯의 實驗을 行한 結果를 報告한다.

## 材料 및 方法

### 1. 實驗材料的 選別

본 研究에서는 우리나라에서 分離, 同定(Lee, et. al, 1976)한 *Aspergillus*屬 150여 野生菌株 중 Czapek培地에서의 protease 生成能이 가장 優秀한 *Aspergillus flavus* KU 153을 選別하여 實驗材料로 使用하였다.

### 2. 培地

生存率 測定이나 野生菌株의 選別에는 Czapek培地를 突然變異株의 選別에는 casein agar medium을 使用하였고(Table. 1) 酵素活性 測定 實驗에서는 wheat bran培地를 使用하였다.

Table 1. Casein agar medium

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.36g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	1.07g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0.50g
NaCl.....	0.10g
ZnCl <sub>2</sub> .....	0.014g
CaCl <sub>2</sub> .....	0.002g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0.002g
Casein.....	4.0g
Casamino-acid .....	0.05g
(Vitamin Free)	
Distilled water.....	1,000ml
Agar.....	15g

### 3. 紫外線 照射 및 生存率 測定

1) Czapek's agar slant에 *A. flavus*를 接種하여 30°C에서 7~10日間 培養하여 充分히 胞子를 着生시켰다.

2) 이 培養管에 10ml의 滅菌蒸溜수를 加하여 白金線으로 胞子를 懸濁시킨 다음 滅菌된 glass wool로 濾過시켜 15分間 振盪하여 胞子를 分散

시켰다. 이 胞子 懸濁液을 Thoma氏 血球計로 適當한 胞子濃度( $10^4 \sim 10^5$  cell/ml)로 稀釋하였다

3) 이 胞子 懸濁液 10ml를 直徑 10cm의 Petri-dish에 넣고 紫外線燈(Toshiba製 紫外線殺菌燈, 15W)바로 밑 5cm 距離에서 30秒~5分間 照射하였다. 紫外線 照射는 photoreactivation(Kelner, 1946)을 防止하기 위해 暗處에서 行하였으며 magnetic stirrer를 使用 계속 攪拌하였다.

4) 照射된 胞子 懸濁液을 適當히 稀釋하여 稀釋液 0.5ml를 Czapek's agar培地에서 30°C에서 3日間 培養하여 發生하는 colony의 數를 3回 平均하여 生存率을 測定하였다.

### 4. 突然變異의 誘發과 優良菌株의 選別

여러가지 致死率을 나타내는 線量에서 照射한 胞子 懸濁液 0.5ml를 casein agar medium에 각각 接種하여 3日間 培養하고 HC-Ratio를 比較하여 對照區 보다도 큰 HC-ratio를 形成하는 突然變異株를 一次로 選別하여 Czapek's agar slant에 移植하였다. 二次選別에서는 이들 一次 選別한 突然變異株를 wheat bran에 接種하여 그 protease活性을 測定 比較하였다.

### 5. 酵素液의 製造

wheat bran 5g에 蒸溜水 4ml를 넣고, 加壓 滅菌한 後 7~10日間 斜面培養한 胞子 1 loop를 上記 培地에 接種하여 35°C에서 3日間 培養하였다. 여기에 蒸溜水 50ml를 加하여 잘 흔들어서 4°C의 冷藏庫에 24時間 放置한 後 filter paper로 濾過하여 그 濾過液을 酵素原液으로 使用하였다.

### 6. Neutral Protease의 分離, 精製

野生菌株와 突然變異株를 35°C wheat bran固體培地上에서 3日間 培養한 後 얻은 酵素原液에 45%飽和 Ammonium Sulfate溶液을 加하여 4°C에서 1日間 放置한 後 遠心分離하여 沈澱物을 除去하였다. 上澄液에 다시 75% Ammonium sulfate를 加하고 4°C에서 1日間 放置한 後 遠心分離하여 沈澱物을 取하고 이를 少量의 0.05M acetate buffer(pH 5.0)에 녹여 4°C에서 여러차례 buffer를 갈아 주면서 약 48時間 透析하였다. Ammonium sulfate의 鹽析에 이어 透析한 酵素溶液은 그 다음 0.05M acetate buffer(pH 5.0)으로 충전한 DEAE-Sephadex A-50 column(3×60cm)에 가하고 0.05M~0.5M의 NaCl를 添加

한 buffer로 계속 용출하여 精製하였다. 용출량은 fraction tube당 5ml로 하고 時間당 60ml의 速度로 용출시켰다. Column을 통해 나온 分割의 中性 protease 活性은 Anson's method로 測定하였고 蛋白質의 量은 280nm에서의 吸光度로 測定하였다.

## 7. 酵素 活性의 測定

### 1) Protease活性의 測定

酸性, 中性 및 알칼리性 protease活性은 Anson's Method(赤掘 1956)에 의해 測定하였다. 0.6% Hammastern milk casein溶液을 pH 3.0, 7.0, 9.0으로 각각 調節하여 基質溶液으로 하였다. 각기 0.6% Hammastern milk casein 溶液 5ml를 試驗管에 넣고 40°C 恒溫水槽에서 5分間 豫熱한 후 여기에 酵素液 1ml를 加하여 잘 흔들어 混合한 後 40°C에서 10分間 反應시킨 다음 0.44M Trichloro acetic acid 5ml를 加하여 이 反應을 停止시키고 40°C에서 25分間 保存한 후 여과하였다. 이 여과액 25ml를 시험관에 넣고 0.55M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 5ml와 Folin試藥(5배 희석액) 1ml를 加하여 40°C에서 20分間 作用시킨 후 파장 660nm에서의 吸光度를 測定하였다. 酵素單位는 1分當 1μg의 tyrosine에 相當하는 吸光度를 表示하는 酵素力價를 1單位로 하였다.

### 2) Cellulase活性의 測定

① Avicelase : Avicelase의 活性은 Somogi-Nelson法에 의하여 測定하였다. 基質溶液으로는 0.2% Avicel을 使用하여 이 溶液 1ml에 0.4M acetate buffer(pH 5.0) 0.5ml와 酵素液 0.5ml를 넣고 50°C에서 1時間 反應시킨 다음 Somogi(1952)의 low alkalinity copper試藥 2ml를 加하고 30分間 加熱한 後 完全히 冷却시켜 Nelson(1944)의 Arsenomolybdate試藥 1ml를 加해 20分間 室溫에서 放置한 다음 20ml의 蒸溜水를 加하여 500nm의 파장에서 吸光度를 測定하였다. Avicelase의 活性度는 酵素液 1ml가 1시간에 Avicel로부터 生成한 glucose의 量으로 表示하였다.

② CMCase 및 Salicinase: CMCase, Salicinase의 活性도 Avicelase와 같은 方法으로 測定하였다. 단 基質溶液을 CMC(Carboxymethyl cellulose), salicin으로 하였고 反應時間은 50°C에서

30分으로 하였다.

### 3) Amylase活性의 測定

① Glucoamylase: Somogi-Nelson法에 의해 測定하였다. 基質溶液인 0.2% soluble starch 1ml와 0.4M acetate buffer(pH 5.0) 0.5ml 그리고 酵素液 0.5ml를 넣고 37°C에서 10分間 反應시킨 다음 low-alkalinity copper 試藥 2ml를 加하여 30分間 加熱한 후 完全히 冷却시켜 Arsenomolybdate試藥 1ml를 加해 500nm의 파장에서 吸光度를 測定하였다. glucoamylase 活性度の 表示方法은 cellulase와 同一하다.

② Dextrinogenic amylase: Fuwa(1954)의 Blue-Value法에 의해 0.2% soluble starch를 基質溶液으로 하여 測定하였다. 基質溶液 2ml와 0.4M acetate buffer(pH 5.0) 1ml를 加하여 37°C의 恒溫水槽에서 5分間 豫熱한 後 酵素液 1ml를 加하여 37°C에서 30分間 反應시킨 다음 0.5N acetic acid 10ml를 加하여 反應을 停止시키고 그 여과액 1ml를 취하여 1/3000N I<sub>2</sub>-KI 용액 10ml로 呈色시켜 700nm에서의 吸光度를 測定하였다. 酵素活性 單位는 37°C에서 30分間 靑色옥소정색을 10% 低下시키는 starch의 mg 數로써 表示하였다.

$$DP_{37^{\circ}C, 30'}^{30'}/mg = 4 \times \frac{D_0 - D}{D_0} \times 100 \div 10$$

DP(Dextrinizing power): Soluble starch의 分解力

D<sub>0</sub>: 공 시험치, D: 시험치

## 結果 및 考察

### 1. 野生菌株의 選別

*Aspergillus* 150여 菌株을 Czapek培地에서 35°C에서 3日間 培養한 後 protease活性을 測定하여 優良野生菌株 10株를 選別하였다. 이들 중 가장 protease活性이 높은 優良菌株은 Strain No. 153이었다. Table 2에서 보는 바와 같이 acid protease活性은 *A. candidus*(Strain No. 171)가 가장 높았으나 neutral protease와 alkaline protease活性은 *A. flavus*(Strain No. 153)가 가장 높았으므로 後者를 parental strain로 選別하였다. 이 菌株은 Fig. 1에서 보는 바와 같이

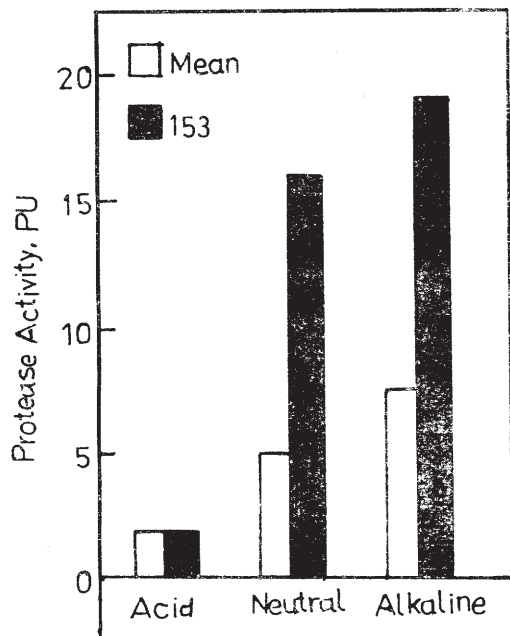
野生菌株의 平均値에 비해 acid protease는 큰 差異가 없었으나 neutral protease 및 alkaline protease 活性은 월등히 높았다.

**Table 2.** Selected parental strain having predominant neutral and alkaline protease activities in Czapek's medium

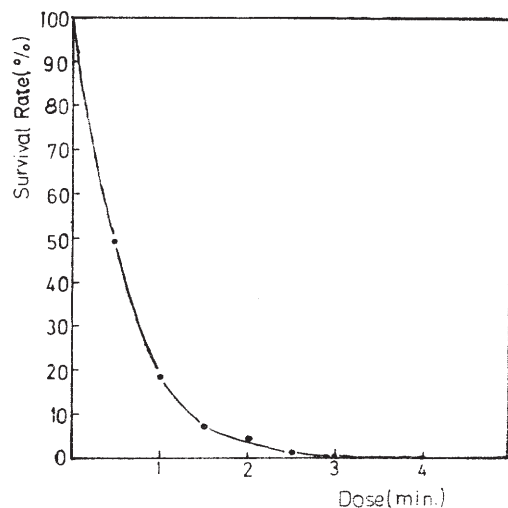
Stain No.	Species	Protease Activity		
		Acid	Neutral	Alkaline
43	<i>A. flavus</i>	0.99	7.91	15.94
51	<i>A. flavus</i>	1.98	5.87	14.52
108	<i>A. flavus</i>	1.11	14.83	18.23
133	<i>A. ochraceus</i>	1.61	15.33	17.49
137	<i>A. flavus</i>	1.98	8.78	11.25
138	<i>A. ochraceus</i>	0.99	12.79	16.81
153	<i>A. flavus</i>	1.73	16.07	19.03
171	<i>A. candidus</i>	2.66	7.91	12.24
176	<i>A. ochraceus</i>	1.98	12.05	15.76
191	<i>A. flavus</i>	1.55	10.38	11.74

## 2. 紫外線 線量에 따른 生存率

紫外線의 線量에 따른 生存率의 變化는 Fig. 2와 같다. 30秒의 照射線量에서는 50% 以上이 死滅하였고 3分의 照射에서는 99.9%의 死滅率



**Fig. 1.** Protease activities of *A. flavus* KU 153 in Czapek's medium.



**Fig. 2.** Survival rate of *A. flavus* KU 153 irradiated with ultraviolet light.

을 나타내었으며 5分 以上の 照射에서는 完全 死滅하였다.

## 3. 強力 Protease生成 突然變異株의 選別

99.9%의 致死率을 나타내는 3分 照射區에서 HC-ratio가 對照區 보다 큰 突然變異株들을 一次 選別하고 이들의 protease活性을 測定比較하여 보다 높은 5菌株의 突然變異株를 2次 選別하였다 (Table 3). 이들 중 酵素活性이 가장 높은 突然變異株는 Strain No. 153-10이었다. 野生菌株와 이 突然變異株의 HC-ratio는 각각 1.7, 2.3이었으며 (Fig. 3) protease活性의 測定值도 parental strain에 비해 크게 增加하였다.

**Table 3.** Selected mutant strains having predominant proteases activities in wheat bran.

Strain No.	Protease Activity		
	Acid	Neutral	Alkaline
KU 153	20.30	41.41	38.23
153-3	25.82	30.34	58.27
153-10	55.62	74.16	69.22
153-56	40.38	60.29	52.48
153-83	50.28	59.24	60.20
153-98	32.63	62.57	60.23



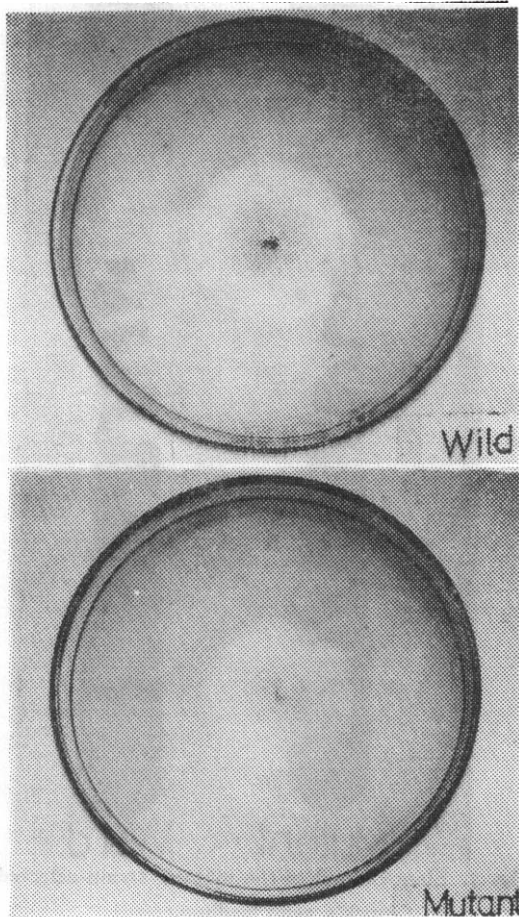


Fig. 3. Clear zones after 72hr. culture at 30°C on the casein agar medium.

#### 4. 突然變異株의 Protease活性

Fig. 4에 突然變異株들 중 가장 強力한 protease를 生成하는 것으로 最終選別된 突然變異株 KU153-10과 母菌株 KU153의 protease活性을 比較하였다. acid protease는 약 2.7배, neutral protease 및 alkaline protease는 각각 약 1.8배의 增加를 나타내었다. 培養時間에 따른 protease의 生成能에도 이 突然變異株는 顯저한 差異를 나타내었다 (Fig 5). 즉 neutral 및 alkaline protease의 경우에 있어서 母菌株는 3日間 培養으로 protease活性이 最大에 이르렀으나 突然變異株에 있어서는 2日間 培養에서 最大가 되었다. 그러나 acid protease에 있어서는 母菌株나 突然變異株가 공히 3일에서 酵素活性이 最大가 되었다 Matsushima *et al.* (1967)은 2株의 突然變異株를 選

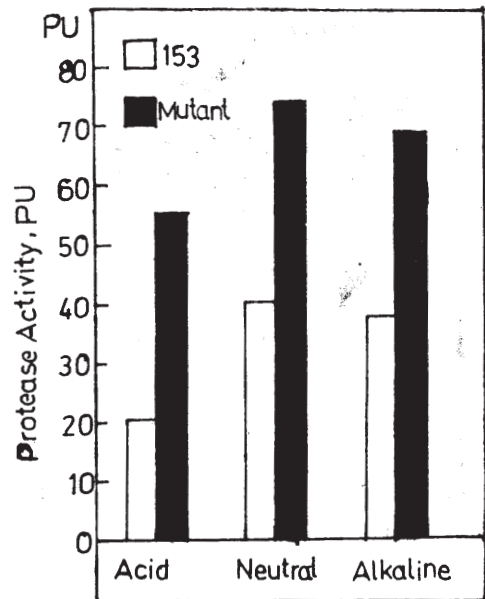


Fig. 4. Protease activities of the mutant strain selected and the parental strain in wheat bran.

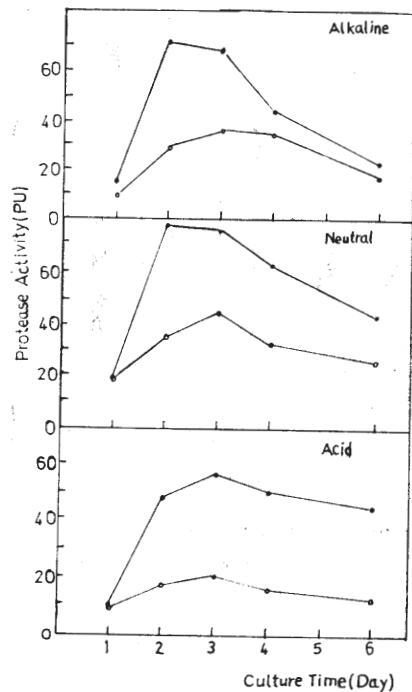


Fig. 5. Changes in protease productions of the parental strain and the mutant strain during the culture in wheat bran.

(○—○ : KU153. ●—● : mutant KU153-10)

別하여 그 protease活性를 測定하고 突然變異株의 경우 4~5일 째에 각각의 protease活性이 最大가 되었다고 報告한 바 있으나 이는 本報에서 소개하는 突然變異株와는 그 性質이 상당히 다른 變異株일 것으로 짐작된다.

##### 5. 突然變異株의 Cellulase 및 Amylase活性

Fig. 6에 突然變異株의 cellulase 및 amylase活性을 野生菌株의 그것과 比較하여 表示하였다. 突然變異株의 cellulase活性은 avicel을 基質로 하였을 때 野生菌株에 비해 약 4배, CMC를 基質로 하였을 때는 약 3.5배 salicin을 基質로 하였을 때는 약 1.7배 높은 값을 나타내었다. 한편 突然變異株는 amylase活性도 野生株에 비해 높은 값을 나타내었는데 glucoamylase는 약 1.5배의 增加를 나타내었으나, dextrinogenic amylase活性에는 큰 變化가 없었다. 이 突然變異株는 이와같이 protease活性이 높을 뿐 아니라 다른 加水分解酵素들도 한결같이 增加하는 경향을 나타내었다. 이는 突然變異株의 protease活性이 높으면 一般的으로 다른 加水分解酵素의 活性도 높아진다는 Sekine *et. al.* (1969)의 見解와 一致한다.

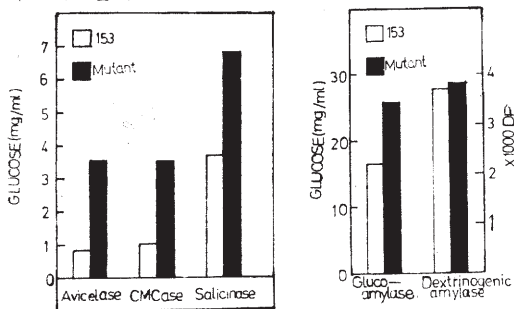


Fig. 6. Cellulase and amylase activities of the mutant strain selected and the parental strain in wheat bran.

##### 6. 突然變異株의 胞子形成能

Fig. 7에서 보는 바와 같이 突然變異株의 경우는 胞子形成이 거의 없고 mycelium만 자란다. 野生菌株의 경우는 Czapek's agar slant에서 2~3일 부터 胞子が 着生하기 시작하여 7~10일 정도가 되면 충분히 胞子が 着生하나 突然變異株의 경우 7~8일 정도부터 胞子が 着生하여 12~15일 정도가 되어야 충분히 胞子が 생겼다. 이는 酵素生成能이 優秀한 突然變異株가 오히려 胞

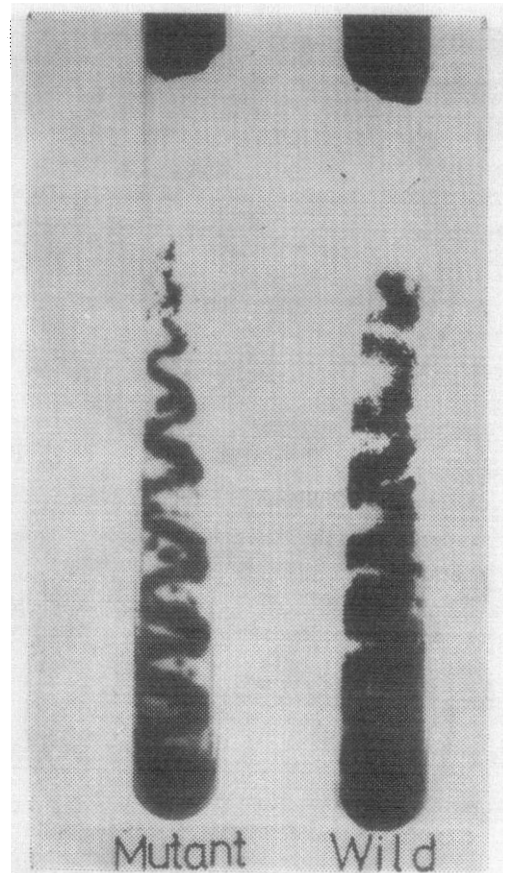


Fig. 7. Slant Culture of the mutant strain selected on Czapek's agar medium.

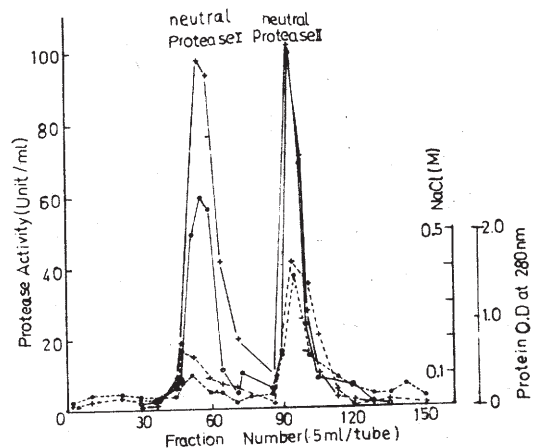


Fig. 8. Column Chromatography, on DEAE-Sephadex A-50.

protease activity, wild strain: ○—○  
mutant strain: +—+  
protein concentration, wild strain: ●—●  
mutant strain: +—+



子生成速度가 빨랐다고 한 Lee and Chang(1965)의 突然變異株나 Sekine et. al.(1969)의 normal type의 突然變異株, 그리고 Matsushima and Shimada(1967)의 albino type 突然變異株와는 전혀 다른 性質의 것이다. 또한 이 突然變異株가 일시적인 突然變異인가의 여부를 확인하기 위해 5個月 동안 주기적으로 酵素活性을 測定하였으나 變化가 거의 없었다.

#### 7. Neutral Protease의 Column Chromatography

이 突然變異株는 neutral protease活性이 가장 높았으므로 이 突然變異가 새로운 isozyme의 형성에 기인하는 것인지의 여부를 밝히고자 neutral protease를 column chromatography로 分離하였다. Ammonim sulfate에 의한 염색과 투석을 통하여 얻어진 40ml의 酵素溶液을 0.05M acetate buffer(pH 5.0)로 충전한 DEAE-Seph-

adex A-50 column(3×60cm)에 가하고 0.05M에서 0.5M로 增加하는 濃度의 NaCl을 첨가한 buffer로 溶出した 結果를 Fig. 8에 表示하였다. Fig. 8에서 보는 바와같이 野生菌株나 突然變異株가 공히 neutral protease에 2個의 peak를 나타내었으며 2個의 peak가 같은 fraction number에서 나타났다. 중성 protease I은 약 0.1M의 NaCl 농도에서 용출되었고 protease II는 약 0.3M의 NaCl 농도에서 용출되었다. 따라서 紫外線에 의한 強力 protease生成能을 나타내는 이 突然變異株는 어떤 constitutive gene의 變化에 의한 새로운 isozyme의 형성에 기인하는 것이 아니라 regulator gene의 變化에 기인한 neutral protease 특히 neutral protease I의 生成增加에 의한 것임을 알 수 있었다.

### 摘 要

우리나라 자연환경에서 분리한 *Aspergillus* 150여 균주중 protease생성능이 가장 우수한 *A. flavus* KU 153을 선별하고, 이에 자외선을 조사하여 돌연변이를 유발시키고, protease생성능이 강력한 하나의 돌연변이주를 선별하였다. 이 돌연변이주의 acid protease 활성은 모주의 그것에 비해 약 2.7배가 높았고, neutral 및 alkaline protease 활성도 각각 1.8배 가량 높았다. 이 돌연변이주는 protease뿐만 아니라 avicelase, CMCase, salicinase 및 glucoamylase등 다른 가수분해효소의 활성도 모주에 비해 월등히 높았다.

배양시간에 따른 이 돌연변이주의 protease 생성능은 acid protease는 3일, neutral 및 alkaline protease는 2일 후에 각각 최대치를 나타내었으나 야생균주에 있어서는 이들 세 protease가 모두 3일 후에 최대치를 나타내었다. 이 돌연변이주의 포자생성능은 접종후 12~15일에 완전히 착생하였으나 야생균주에 있어서는 7~10일에 완전 착생하였다. Column chromatography에 의한 neutral protease의 분리실험에서 이 돌연변이주는 다른 isozyme의 생성을 유발한 것이 아니라 regulatory gene의 변화에 기인한 것임을 알 수 있었다.

### REFERENCES

1. Folin, O., and V. Ciocalteu., 1927. Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, **73**, 627—650
2. Fuwa, H., 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem.*, **41**, 583—603.
3. Han, H.E., 1977. Amylase production by continuous cultures of *Aspergillus oryzae* and its mutant. *Kor. Jour. Microbiol.*, **15**(2), 63—76.
4. Iguchi, N., 1955. Studies on *Aspergillus*(10). Changes of enzyme activities and induction of a mutant having higher proteolytic activity in *Aspergillus sojae* by induced mutation. *Jour. Agr. Chem. Soc. of Japan.*, **29**(1), 73—78.
5. Iizuka, H. and H. Arai., 1961. Studies on the mutation of *Aspergillus usami* and others(3). Gamma ray induced mutation. *Jour. Agr. Chem. Soc. of Japan.*, **35**(12), 1218—1223.
6. Ishiie, S., 1966. Studies on the production of ferriccolor-reactive substance by *Aspergillus* species (2). Kojic acid production by UV-irradiated strain of *Aspergillus oryzae*. *Jour. Agr. Chem. Soc. of Japan.*, **40**(10), 359—363.
7. Kelner, A., 1949. Photoreactivation of ultra-

- violet irradiation *Escherichia coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation. *J. Bact.* **58** 511—522.
8. Lee, K.H. and Chang, K.H., 1965. Studies on koji for soy sauce brewing (3). On the producibilities of proteases, amylase and vitamins by UV-induced mutants of *Aspergillus oryzae*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **3**(2), 9—14.
  9. Lee, Y.N., N.J. Kim and H.W. Suh 1976. Cellulase activity of *Aspergilli* distributed in South Korea(1). Isolation and identification *Aspergilli*. *Kor. of Jour. Microbiol.*, **14**(3), 105—116.
  10. Mandels, M., Weber, J. and Parizek, R., 1971. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma*, *App. Microbiol.*, **21**(1), 152—154.
  11. Matsushima, K. and K. Shimada., 1967. On the proteolytic systems of UV-mutants of *Aspergillus niger*. *Agr. Biol. Chem.*, **41**(12), 671—674.
  12. Maxwell, M.E., 1950. Enzymes of *Aspergillus oryzae*(2). The yield of enzymes from mutants produced by ultraviolet irradiation. *Australian J., Sci. Research, Ser. B*, **5**, 56—63.
  13. Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **195**, 375—380.
  14. Sekine, H., S. Nasuno and N. Iguchi., 1969. Isolation of highly proteolytic mutants from *Aspergillus sojae*. *Agr. Biol. Chem.*, **33**(10), 1477—1483.
  15. Somogy, M., 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375—380.
  16. 赤堀四郎編. 1956. 酵素研究法 II. 242—246.