

微生物의 細胞生理에 미치는 電離放射線의 影響에 關한 研究(第3報)

酵母菌의 蛋白質含量 및 Free Amino acid Pool에 對한 γ -ray의 影響

金 鍾 協

(原子力研究所·生物學研究室)

Studies on the Cellular Metabolism in Microorganisms as Influenced by Gamma-irradiation. (III)

On the Changes of Protein content and Free Amino acid Pool in Yeast cells irradiated by γ -ray.

Kim, Jong Hyup.,

(Div of Biology, Atomic Energy Research Institute, Korea)

Abstract

Kim, Jong Hyup., (Div. of Biology, Atomic Energy Research Institute, Korea;) Studies on the Cellular Metabolism in Microorganisms as influenced by Gamma-irradiation (III): On the Changes of Free Amino acid Pool and content of Protein in Yeast cells irradiated by γ -ray.

1. The strain of *Saccharomyces cerevisiae* had been cultured synchronously in aerobic condition and irradiated by gamma-ray from the source of cobalt-60. Drying in vacuum oven at 90°C over 12 hours, then changes of protein content(Kjeldahl) and free amino acid pool have been assayed with use of spectrophotometer. Results obtained were compared with those of unirradiated normal cells.

2. It is proved that amount of protein content in the irradiated cells increases to seven percent more than those of normal cells in the same weight of dried samples. It seems like carbohydrate breakdown had been stimulated by irradiation and that relative contents of protein shows higher values than those of normal in the same weight of samples.

3. The amount of free amino acid pool in the irradiated cells shows less value about ten percent than those of normal cells, and rate of decreasing is also weak than those of standard reagent solution of amino acid. We may assume that free amino acid pool would be protected against radiation damage in living cells and more stable than in vitro.

4. The component of free amino acid pool have been assayed on second dimensional paper chromatogram, and the identified amino acids are as follows; aspartic acid, serine, glutamic acid, cystine, lysine, glycine, threonine, histidine, arginine, tyrosine, phenylalanine, valine and leucine.

5. Distributional presence of free amino acids are identical to that of normal cells except arginine, it is consumable that radiation effect is universal to all amino acid. However it is obvious that there are differences in radiolabilities of amino acids in irradiated cells.

緒 論

純結晶狀態의 蛋白質이 水溶液狀態에서 放射射의

照射를 받았을때에 일어나는 變化에 對해서는 여러 報文이 있다. (Hatano, 1967.⁽⁶⁾, Shimazu and Tapel, 1964⁽¹⁵⁾).

放射線食品照射의 研究가 活潑히 進行되는 동안에 食品의 wholesomeness(健全性)을 위하여, 照射된 食品材料의 蛋白質 및 Amino acid의 定量·定性的 研究가 많이 이루어졌다. (Shirai, 1966⁽¹⁷⁾, Slavin et al, 1966⁽¹⁸⁾)

한편 醫學方面에서는 放射線 被爆者의 組織 및 器官等에 對하여 蛋白質代謝 및 Amino 酸含量等에 對하여 많은 data를 내고 있다.

그러나 放射線의 生物學的 效果는 simply 되고, Synchronize된 微生物 細胞를 材料로 하여야만 有益한 結論을 얻을수 있다고 믿어진다. (R.H. Haynes, 1966⁽¹⁹⁾)

最近, Karlsruhe의 放射線微生物學者들은 Fruit juice의 放射線殺菌 研究計劃에서 酵母菌의 致死, 生理作用에 對하 一連의 研究를 進行 시키고 있다. (K. Kaindl, 1966⁽¹⁰⁾)

그러나 酵母細胞內에서 生理的 重要性을 지닌 free amino acid pool에 미치는 γ -ray의 影響에 對해서는 研究가 아직 없다. 다만 化學試藥品인 amino 酸을 試驗管內 溶液狀態로 하여 照射效果를 研究한 例는 더러 있다. (Shirai, 1966⁽¹⁷⁾, Shimazu & Tappel, 1964⁽¹⁵⁾)

그러므로 細胞內에서 Free amino acid와 Protein이 放射線에 依하여 어떻게 變化하는가를 追究하고 細胞生理學的 意識를 究明코저 本 研究를 實施하였다.

材料 및 方法

酵母菌의 大量液體培養

*Saccharomyces cerevisiae*를 Table. 1.과 같은 組成의 液體培地內에서 aeration과 agitation을 繼續하면서 water bath(30°C 恒溫)에서 48時間 培養하였다. 培養이 完了하며는 basket type의 Centrifuge로 서 菌體를 붓고, 이것을 0.8% NaCl saline water로 2~3回 washing하고 다시 Centrifuge로 集菌하였다. 集菌後는, 菌體를 0.8% saline water에 懸濁

시켜서 γ -ray 照射操作으로 넘겼다.

γ -ray의 照射

γ -ray의 照射는 本原子力研究所에 備置되어 있는 Panoramic γ -irradiator, Cobalt-60, 1,000 curies를 使用하였으며, 照射線量은 200,000 rentgen 이었다. 이 線量은 酵母의 endogenous respiration이 5%減少하는 dose이다. ⁽²¹⁾

Free amino acid의 fractionation schema.

放射線(γ -ray)照射를 받은 酵母菌의 懸濁液을 直時 遠沈·濾過한後 vacuum drying oven에서 真空 乾燥(90°C, 12hrs)하였다. 乾燥된 菌體를 1.0g 秤量한後, 10倍量의 80% Ethyl alcohol로 서 Reflux condenser를 달고 boiling(30mins.)하여 Ethanol soluble인 Free amino acid를 抽出하였다. ⁽³⁾⁽¹⁶⁾抽出液을 1/10量의 active carbon으로서 不純物을 吸着 除去後, Ion-exchange resin(I.R. Amberlite 120)의 column을 通過시켜, Amino acid를 吸着시켰다. 吸着된 Amino acid는 2N-ammonia water 100c.c.로 서 每分 2~3c.c.의 流速으로 溶出시켰다. ⁽¹⁹⁾溶出液을 Heating하여 ammonia를 蒸發除去한後, 0.2%의 Ninhydrin-butanol solution으로서 7分間 boiling하면서 發色을 시켰다. 照射區와 對照區와 의 比色定量이 있음으로, 操作은 恒常 同一條件과 同一容量으로 맞추면서 實施되었다. 發色溶液은 Spectrophotometer Baeckman B type, 570m μ 의 波長에 對한 吸光度를 測定하고, 미리 準備된 16種의 standard amino acid의 standard curve에 견주어서 Total amino acid의 含量을 比色定量하였다. (Fowden, 1951⁽⁴⁾⁽¹⁵⁾)

分劃操作을 表로서 나타내며는 Fig. 1.과 같다. (Satake, 1955⁽¹⁰⁾)

Total Nitrogen의 定量

Vacuum drying oven에서 乾燥한 菌體를 照射區 對照區別로 1.0g 式 秤量하여 Micro Kjeldahl method에 依하여 Total-N量을 決定하였다.

Free amino acid의 paper chromatography.

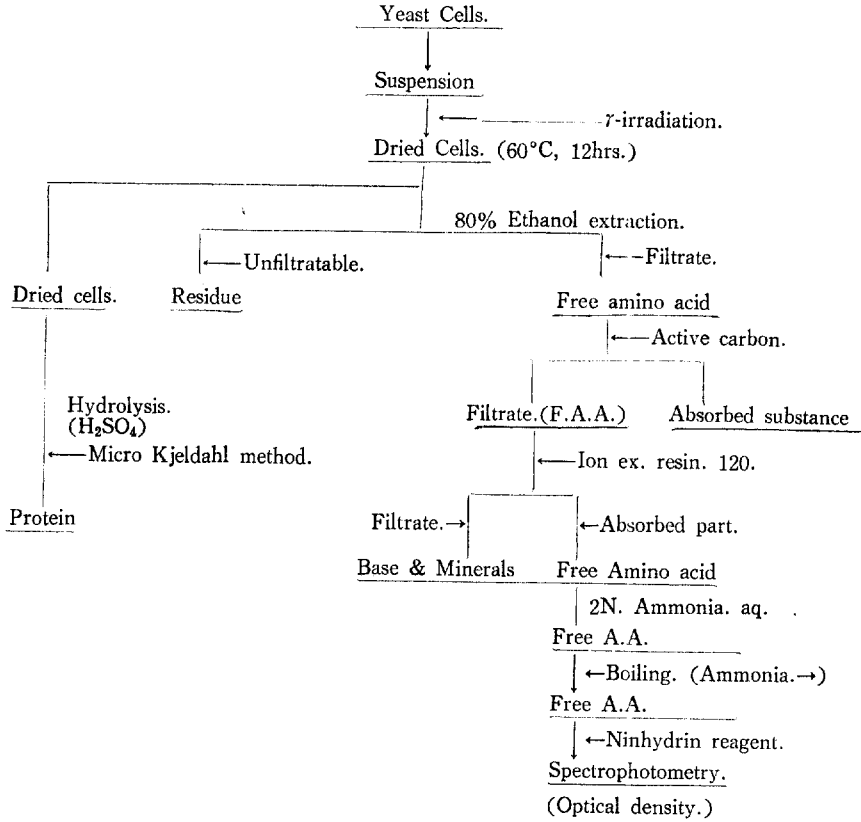
Ion-exchange resin을 通過시켜서 얻은 Free amino acid를 rambda pipet로 서 一定量式 Whatman No.2 濾紙에 spotting한後, phenol water(一次), Butanol, acetic water(二次)의 溶媒를 使用하여 二次 元으로 上昇法으로 展開시켰다. 展開가 끝나며는 風乾하고, 0.2% Butanol-ninhydrin reagent로 서 100°C, 5分間發色시켰다.

各斑點은 standard의 R.f. value에 맞추어서

Table. Culture media for yeast.

Peptone	1.0%
Glucose	5.0%
Yeast extract.....	0.3%
Wort.....	48c.c.(Bg. 10°)
KHPO ₄	0.2%
MgSO ₄	0.1%
Distilled water.....	454c.c.
Total.....	100c.c.
p.H. = 5.4,	15LBs, 15min.

Fig. 1. Fractionation schema for Amino acid. (Free from)



定性的으로 分布를 確認하였다.

實驗 結果

1) Total Nitrogen의 含量變化는 Table.2와 같다.

Table. 2. Total-Nitrogen, in yeast cells influenced by γ -ray.

Expt.	(mg/g. of dry wt.)			Remark.
	Nitrogen Total-N	Total Protein	Percentage.	
R ⁻ .A ⁻	69.8	436.3 (mg)	100 (%)	Micro Kjeldahl.
R ⁺ .A ⁻	73.2	457.5	105	"
R ⁻ .A ⁺	74.0	462.4	100	"
R ⁺ .A ⁺	78.9	493.4	107	"

※ R⁻.A⁻....Unirradiated and Unacrated in saline aq.
 R⁺.A⁻....Irradiated and unacrated in saline aq.
 R⁻.A⁺....Unirradiated and aerated in saline aq.
 R⁺.A⁺.....Irradiated and aerated. in saline aq.
 Irradiated dose;200,000 rentgens.

2) Free amino acid pool의 含量變化는 Table. 3.과 같다.

Table.3. Changes of free amino acid pool in yeast clls irradiated by γ -ray. (mg./g. dry. wt)

Expt.	F.A.A.P.	
	Free amino-acids	Percentage
R ⁻ .A ⁻	414.6(mg)	100(%)
R ⁺ .A ⁻	386.3	93.2
R ⁻ .A ⁺	424.58	100
R ⁺ .A ⁺	385.4	90.8

※ R⁻.A⁻, R⁺.A⁻, R⁻.A⁺, and R⁺.A⁺, are shown in Table.1. Irradiated dose; 200,000 rentgens.

3) Free amino acid pool의 paper chromatography는 Fig.3.과 같다.

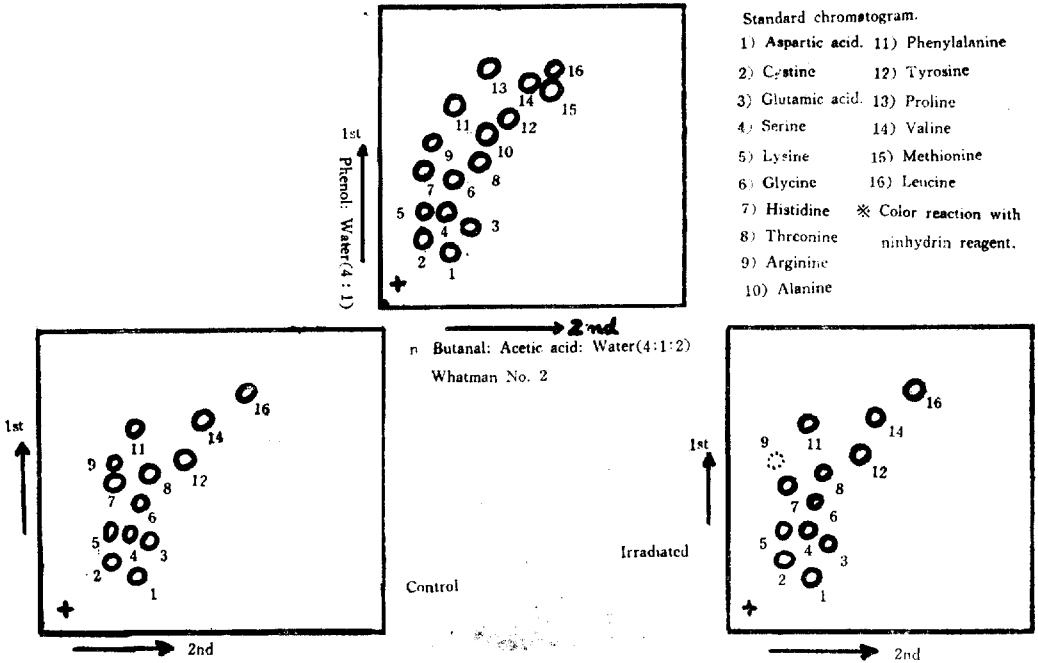


Fig. 3. Second dimensional chromatogram of Free amino acid in yeast cells irradiated.

4) Free amino acid의 spectrophotometry의 결과는 Fig. 2.와 같다.

考 察

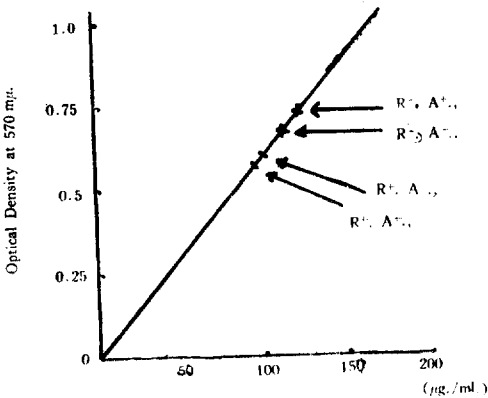


Fig. 2. Optical density of Free amino acids in Yeast cells and Standard curve of standard amino acid mixtures.

- R-.A+,.....Unirradiated, and aerated.
- R+.A-,.....Unirradiated, and unaerated.
- R+.A+,.....Irradiated, and unaerated.
- R+.A+,.....Irradiated, and aerated.

放射線照射區에서 arginine 이 나타나지 않았으며, ninhydrin 에 의한 呈色反應의 濃淡差가 보였으나 Fowden,⁽⁴⁾氏가 行한 paper spot 를 elution 하는 操作은 實施하지 않았다,

Table. 2에서 보는 바와 같이 放射線을 照射한 酵母菌細胞의 總蛋白質量(Kjeldhal-N)은 同一重量의 乾燥細胞(對照區)에 比較하여 5~7% 많았다.

이 點을 考察하건대 放射線照射로 因하여 Protein 合成이 促進되었다고는 볼수 없다. 그 理由는 酵母菌이 2~3回 saline water 로서 洗滌되었으며 saline water 에 懸濁되어 있었음으로 Nutrient nitrogen source 가 없는 가운데서의 Protein 合成을 생각 할수 없는 것이다.

또 放射線照射에 依하여 合成이 促進된다는 報告도 없다.

200,000 rentgen 以下の 線量에서 endogenous respiration 이 活潑해진것으로 보아 carbohydrates 가 呼吸基質로서 消耗되었다고 볼수 있으며, 細胞膜의 損傷으로 因하여 細胞內의 carbohydrates 가 外部로 流出한 것이 그다음 原因일것이다. (Billen,1953)

따라서 蛋白質量이 照射區에서 더욱 增加值를 나타낸것은 兩區의 單位重量(mg. per dry weight)當의 carbohydrates 의 含量差에 依한 것이다.

放射線照射區의 酵母菌細胞에 對하여 自家呼吸(通氣를 시켰음)을 하게 한것은 protein 量이 8% 比較의므로 많았다. 即 呼吸에 依하여 carbohydrate 가

많이 消費된區(照射區)가 protein 이 많은 것이다. 實際로 細胞가 放射線을 照射받으려는 呼吸量이 增加하는 것이다. (Caputo, 1960, Kim, 1967⁽²¹⁾, (Ontko et al 1964⁽¹³⁾.)

한편 200,000 rentgen 의 放射線照射에서는 酵母生細胞의 蛋白質이 分解되지 않는것 같다. 이點은 enzyme activity 가 200,000r. 에서도 低下하지 않는 것으로도 알수 있는 것이다.

Free amino acid pool 에 對한 放射線照射의 影響을 보려는 蛋白質의 경우와는 異異하게 다르다. 即 Fig.2 와 Fig.3 에서 보는 바와 같이, 對照區(非照射區)에 比하여 free amino acid 의 量은 모두 93.2% 및 90.8%로 減少하고 있다. R⁺.A⁻.區는 放射線照射後, 嫌氣性呼吸을 시킨것이며, R⁺.A⁺, 는 放射線照射後 好氣性呼吸을 시킨것이다. R⁺.A⁻ 와 R⁺.A⁺ 의 比는 0.2% 差異밖에 나지 않는다. (389./385.4 × 100 = 100.2%). 即 free amino acid pool 는 呼吸基質로서 消耗된 것이 많음을 알수 있다. Free amino acid pool 의 變化機作에 對해서는 두가지 面에서 생각할 수있다. 첫째는 amino 酸을 基質로 하는 G.D.H.(Glutamic dehydrogenase) 와 G.O.T.(Glutamic-oxaloacetic transaminase) 등의 activity 의 增加로 인한 amino 酸의 減少를 들수있다. (Kim. J.H., 1967, ⁽²¹⁾ Albaum, 1960). 둘째는 Radiolysis (放射化學의 分解)로 인한 Amino 酸의 分解現象이며, Shirai, (1966)⁽¹⁶⁾氏는 Standard reagent amino acid 의 混合溶液은 270,000 rentgen 에서 37%가 減少한다고 하며, Tappel 氏 (1964)⁽¹⁵⁾도 free amino acid, (standard reagent)의 減少를 指摘하고 있다. 그러나 上記人들은 生細胞內의 free amino acid 가 아니라 化學純品の 水溶液을 材料로 하였은 것임으로 分解率이 意外에도 크며, 本實驗의 data 와는 相當한 差가 있다. 그 理由를 考察컨데 生細胞內에서 free amino acid 가 그와 混在해 있는 他成分들의 保護效果를 받는 것으로 看做되며, 이點은 Hatano 氏 (1967)의 Electron Spin Resonance 를 使用한 生體物質의 純도에 따른 radiolability(放射分解能)의 變化研究에서 究明되었은 現象이다. 이와같이 생각할때에 200,000 rentgen 의 照射量과 生細胞內다는 點으로 보아서 10% 程度의 減少밖에 없다는 것은 오히려 當然하다고 보아진다. amino acid 의 抽出 및 分離操作에서 極少量의 低級 peptide 의 混入을 생각할수도 있는데, 이 混入된 低級 peptide 의 除去는 困難하며, 普通 稀釋鑛酸으로서 分解시키지 않는 amino acid 自體도 若干 分解될 可能性이

있으므로 Digestion process(鑛酸分解)를 省略하였은 것이다. 低級 peptide 와 amino acid 와의 radiolability 가 같지 않다고 한다면은 低級 peptide 만을 分離하여 그 radiolability 를 別途로 追究하여야 할 것이나 實際적으로 實驗操作이 저극히 困難할것으로 본다. (Akabori, 1959 年)

Free amino acid 의 Spectrophotometry 에 關하여 考察하면은, ninhydrin 의 發色操作에 있어서 새로운 知見을 얻었다. 即 amino acid 의 含量이 1ml. 溶液當 10 μ g 以下일때에는 water bath 에서 加熱하여서는 發色이 되지 않으며, heater 上에서 10 分 程度 長時間 boiling 하여야만 發色이 이러난다는 點과 color density 를 maximum 으로 내기 위하여서는 boiling time 을 正確히 把握하여야 한다는 것이다. heating time 에 따라서 또는 amino acid 의 含量에 따라서 color 의 density 는 極히 銳敏하게 달라지는 것이다.

Amino acid 를 Ion-exchange resin 의 column 에 通過시킬때에도 flowing speed 와 resin volume 은 莫大한 影響을 나타 내었다. 即 sample 의 量에 比하여 resin 의 volume 이 적으면은 amino acid 가 逸失되고, 또 反對로 많으면은 溶出이 되지 않는 것이다.

Amino acid 의 定量에 있어서 Sørensen 法의 formol titration 을 實施하여 보았으나 正確度에 있어서 Spectrophotometry 를 따르지 못할 뿐만 아니라, (1,000 μ g/ml 以下는 檢出困難) proline, tyrosin, arginine, lysine 等이 測定되지 못함으로 實際含量을 完全히 나타내지 못하는 것이다. Fig.3 의 standard curve 는 16種의 free amino acid (chemical reagent) mixture 의 color 의 optical density 를 測定한 것이다. 酵母菌의 生細胞로부터 抽出한 free amino acid 는 Fig.1 과 같은 fraction 을 결쳐서 精製分離 된다. Ninhydrin 反應을 하여 그 發色液의 optical density 를 absorbancy 로서 測定하고 x-軸의 μ g/ml.單位의 含量을 reading 하였다. (Fowden, 1951⁽⁴⁾)

Paper chromatography 를 使用한 free amino acid 의 定性的分析方法是 Fowden 法⁽⁴⁾에 依하여 實施 하였으며, chromatogram 은 一次에서 Phenol: water (4:1), 二次에서 n-Butanol:Acetic acid: water(4:1 :2)로 Whatman No.2 上에서 展開하였다. 酵母菌의 free amino acid 組成은 map 上에서 Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Cystine, Lysine, Glycine, Threonine, Histidine, Arginine, Tyrosin, phenyl-

alanine, Valine, 및 Leucine 등의 13種이 分布하였다. 各組成成分의 含量은 Freeland & Gale, 1947, ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾, Stokes and Gunnes, 1946, ⁽¹⁸⁾ Lindan, 1951⁽¹²⁾ 등에 詳細히 밝혀져 있다. 對照區(非照射區)와 照射區의 酵母細胞에 있어서 定性的變化는 다만 照射區에서 arginine 이 나타나지 않았다는 點이다. arginine 은 Shirai, 1966⁽¹⁶⁾ 氏에 依하면 放射分解率이 中等度에 屬한다고 하므로 生細胞內에서 放射分解率이 어떻게 變動하는가는 定量的으로 追究할 必要가 있다.

大體으로 볼때에 Free amino acid pool 는 全體的으로 量이 減少하는 것으로 생각된다. 卽 그 理由로는 Control 區와 照射區의 兩者 사이에 定性的으로는 分布上的 異狀이 없기 때문이다. paper

chromatogram 上에 斑點으로 나타나는 限界는 大略 0.3r(0.3 μg/ml) 以上임으로, arginine 과 같이 斑點이 나타나지 않았다 하더라도 斑點만으로는 成分의 定量的差異를 分析할 수 없는 것으로 생각된다. original spotting 의 量은 約 50r 이었다.

따라서 放射線의 細胞內 free amino acid pool 에 對한 影響은 어떤 成分에 特異적으로 作用하는 것이 아니며 amino 酸 全般에 걸쳐서 미치고 있음을 알수있다. 또 純試藥을 混合하여 만든 amino acid 의 溶液과 生細胞內의 free amino acid pool 와는 放射線에 依한 影響이 다르다는 것을 알수 있는 것이다. (Shimazu and Tappel, 1964⁽¹⁵⁾, Shirai, 1966⁽¹⁶⁾)

摘 要

1. 酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞를 同調培養한後, γ-ray 를 照射하여 乾燥시키고, 細胞의 蛋白質量(Kjeldahl-N.)과 Free amino acid pool 의 變化를 追究하였다.

2. 酵母菌細胞의 蛋白質量(Kjeldahl N.)은 同一重量의 比較에 있어서 放射線照射區의 細胞에서 더욱 많았다. 이것은 同重量의 照射區 細胞內의 carbohydrate 含量이 對照區보담도 더욱 減少한데에 그 原因이 있다.

3. 酵母菌細胞의 free amino acid pool 는 放射線照射區의 것이 對照區 보담도 더욱 減少하였다. 그 減少現象은 呼吸方式의 差異에서도 變動하지 않았다. 따라서 amino acid 는 radiolysis 나 enzymic degradation 의 結果減少한 것이다. Free amino acid pool 는 生細胞內에서 保護作用을 받고 있음을 알았다.

4. 酵母菌細胞로부터 ethanol 抽出한 free amino acid 는 ion-exchange resin(I.R. Amberlite 120)을 通하여 分離되고, spectrophotometer 로서 吸光度를 測定하였다.

5. Free amino acid 를 paper chromatography 로서 展開시키고 그 定性的 分布狀況을 追究하여 13 種의 amino acid 를 確認하였다. 그 種類는 Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Cystine, Lysin, Glycine, Threonine, Histidine, Arginine, Tyrosin, Phenylalanine, Valine, Leucine 이었다. 放射線照射區와 對照區의 兩區에서 이들 amino acid 의 分布는 同一하게 確認되었으므로, Free amino acid 의 量的減少는 amino 酸全般에 걸쳐서 이러하는 것이다.

References.

- 1) Ambe, K.S., and Tappel, L., 1961. Improved seperation of amino acids with a new solvent system for two dimensional paper chromatography. J. of Chromatography. 5; 546-54 6-548.
- 2) Block, R. G., and Bolling, D., 1954. A note on the amino acids yielded by yeast, sun flower seed meal, and sesame seed after hydrolysis of the fat free tissue. Vol. 6. No. 2. P 277-280. Archives of Biochemistry.,
- 3) Cook, A. H., 1958. Aspects of the chemical composition of Yeast. The Chemistry and Biology of Yeasts. P. 157-250. Academic Press Inc. N. Y.
- 4) Fowden, L., 1951. The quantitative recovery and colorimetric estimation of amino acids separated by paperchromatography. Vol. 48. 327-333. The Biochemical J.
- 5) Fowden, L., 1950. Elimination of losses in the quantitative estimation of amino acid by paper-chromatography. Nature. 195. 846-847.
- 6) Freeland J. C., and Gale. E. F., 1947. The amino acid composition of certain bacteria and yeasts. The Biochemical J. Vol. 41. P 1335.

- 7) Gale, E. F., 1947. Studies on composition of free amino acid in yeast. *J. Gen. Microbiol.*
- 8) Hatano, H., 1967. Radiation effects on amino acids, proteins and enzymes in various states. Vol. 2. No. 1. 78-85. *Food Irradiation, Japan.*
- 9) Haynes, R.H., 1966. The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena. *Biochemical studies of macromolecular synthesis after irradiation.*, *R. adiation Research, Suppl.* 6. 1-29.
- 10) Kaindl, K., 1966. International project on the irradiation of fruit and fruit juices. *Food Irradiation, Proceedings of a symposium at Karlsruhe, 6-10. June 1966.* P 701-729. I.A. E.A. Vienna.
- 11) Kinnamon, K.E., and Sutter, J.C., 1965. Radiation and wound healing, A study of the role of sulfur amino acid. *Radiation Research,* 25; 566. 1965.
- 12) Lindan, O., and Elizabeth W., 1951. The amino acid composition of the yeasts used to produce massive dietic liver necrosis in rats. Vol. 48. 337-344.
- 13) Ontko, J.A., 1964. Increased endogenous respiration of ascites tumor cells after radiation exposure. *Radiation Research.*, 25. 135-144.
- 14) Partridge, S. M. and Brimley, R.C., 1952. Displacement chromatography on synthetic ion-exchange resins. 8. A systematic method for the separation of amino-acids. *Biochem. J.*, Vol 51. 628-640.
- 15) Shimazu, F., and Tappel, A.L., 1964. Comparative radiolability of amino acids of proteins and free amino acids. *Radiation Research,* 23. 203-209. 1964.
- 16) Shirai, K. and Oku, T.T., 1966. Stability of amino acid and chnges of Amino acid component of irradiated fish. *Food Irradiaton.* Vol. 1. No. 1. P 46-51.
- 17) Slavin, J. W., et al. 1966. Status of research and developmental studies of radiation pasteurization of fish and shblol fish in the United States. *Food Irradiation, Proceedings of a Symposium, Karlsruhe. June. 1966.* P 1509-547. I.A.E.A. Vienna.
- 18) Stokes, J.C. and Gunnes, M., 1946. The amino acid composition of microorganisms. *Journnal of Bacteriology.* Vol 52. P 192.
- 19) Satake, K.O., 1955. Chapter. 4. Paper chromatography. *Chromatography.* P102-147. Kyoritsu Publ. Co. Tokyo.
- 20) Zamecnik, P.C., and Keller, E. B. etal 1956. Studies on the Mechanism of protein synthesis. Ionizing radiations and cell metabolism. *Ciba Foundation Symposium.* P 161-173. London.
- 21) Kim, J.H., 1967. Studies on the Cellular Metabolism in Microorganisms. (II). *Korean J. Mierobiol.* Vol. 5. No.2.