

Bacteria 가 生産하는 Cystinedesulfhydrase 에 關한 研究

(第一報) Cystinedesulfhydrase 生産菌의 分離檢索 및 同定

崔 瑢 鎭·梁 漢 喆*

同德女子大學 食品營養學科

*高麗大學校 農科大學 食品工學科

Studies on Cystinedesulfhydrase produced by Bacteria.

(Part 1) Isolation and Identification of Cystinedesulfhydrase producing Bacterium.

Choi, Yong-Jin · *Yang Han-Chul

Dong Duck Women's College

*Collage of agriculture, Korea University.

(Received January 29, 1974)

Abstract

1. In the course of investigation on the metabolism of cysteine by microorganisms, the authors have found that among 70 strains tested Cystinedesulfhydrase occurred most remarkably in the cells of the strain I-3-2 isolated from the soil when it was grown on a medium containing L-Cysteine.

The morphological, cultural and physiological properties of this strain were investigated. From the results, the bacterium was identified as a variety of *Aerobacter aerogenes*.

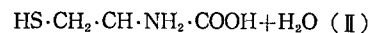
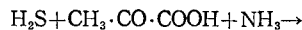
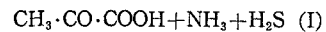
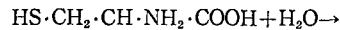
2. The cultural conditions for the formation of Cystinedesulfhydrase by the strain I-3-2 were also investigated and the results were as follows:

- 1). The optimum pH of the culture medium was 7.0-7.5. 2). As a carbon source, glycerol was most effective when it was added to the basal medium at 0.1% concentration.
- 3). By addition of calcium chloride at 0.2% concentration, the formation of the enzyme remarkably increased. 4). Maximal formation of the enzyme was observed at the end of logarithmic phase of cell growth, thereafter the enzyme activity was diminished rapidly.

序 論

cystinedesulfhydrase (L-Cysteine hydrogen sulfide-lyase, deaminating, EC 4. 4. 1. 1.)는 L-cysteine 을 pyruvate, ammonia 및 hydrogensulfide 로 分解시키는 反應, 즉 L-cysteine 의 α, β -elim-

ination reaction(反應 1)을 촉매하는 pyridoxal phosphate를 cofactor로 必要로하는 소위 vitamin B₆ 酵素群중의 하나로서 오래전부터



많은 研究報告⁽¹⁻⁸⁾에 依해 生物界에 널리 分布되어 있다는 事實이 잘알려져 왔음에도 不拘하고 이 酵素에 對한 研究는 比較的 不進하였다 고 하겠다. 最近에 이르러 G. Guarneros⁽⁹⁾ 등이 *Salmonella typhimurium* 과 *Escherichia coli* 로부터 cystine 을 誘導劑로 해서 cystinedesulfhydrase 를 誘導生産하여 이 酵素의 몇가지 性質과 아울러 酵素生産條件을 檢討한바 있고 또한 Collins⁽¹⁰⁾는 *S. typhimurium* 의 細胞抽出液을 단지 數倍程度 精製한 酵素液을 使用하여 cystinedesulfhydrase 의 kinetic properties 에 關해 많은 研究를 하였으며 특히 Nicholas⁽¹¹⁾ 등은 *S. typhimurium* 의 酵素抽出液을 約 1,700배까지 精製함으로써 거의 單一狀의 酵素液을 얻어 分子量과 分子構造를 中心으로한 cystinedesulfhydrase 의 物理化學的 諸性質을 研究報告하고 있으나 아직 cystinedesulfhydrase 의 結晶純品을 얻었다는 報告는 없다. 따라서 本研究는 多數의 保存菌과 土壤分離菌으로부터 既知의 菌株보다 cystine 分解能이 더욱 強한 새로운 菌株을 分離檢索하여 cystinedesulfhydrase 의 精製方法과 結晶酵素의 諸性質을 檢討함과 아울러 cystinedesulfhydrase 역시, tyrosine 과 tryptophan 의 α, β -elimination reaction 에 있어서 其分解生成物인 pyruvate 와 ammonia 等の 濃도가 充分히 큰 反應系에 있어서는 分解反應의 逆反應을 同時에 觸媒함으로서 各各 tyrosine 및 tryptophan 과 이들의 誘導體의 合成을 可能케 하는 소위 多機能酵素라고 불리우고 있는 tyrosine phenolylase⁽¹²⁻¹⁵⁾ 와 tryptophanase⁽¹⁶⁾ 등과 같은 機能을 가지고 있을 것으로 推定되어 L-cysteine 分解反應의 逆反應(反應 II)에 依해 즉 pyruvic acid 를 炭素骨格으로 하여 L-cysteine 및 其誘導體인 含硫 amino acid 의 酵素의 合成方法을 확립 해보고자 하는것이 本研究의 目的인바 本報에서는 保存 및 土壤分離菌으로부터 L-cysteine 分解能이 큰 새로운 菌株의 分離檢索과 選定菌株의 同定 및 其培養條件을 檢討하여 그 結果를 報告 한다.

實驗材料 및 方法

(1) 使用菌株

保存 및 土壤分離菌中 L-cysteine 分解能이 가장 컸던 土壤分離菌株 NoI-3-2를 供試菌株로 使用하였다.

(2) 分離用培地

培地組成은 meat extract 0.5%, yeast extract 0.3%, polypeptone 0.5%, 및 sodium chloride 0.2%를 포함하고 있는 基礎培地에 誘導劑로서 L-cysteine 을 0.2% 添加한것을 分離用培地로 使用했다.

(3) 培養方法

肉汁寒天斜面培地에 30°C, 48時間 培養한 供試菌體 1白金耳를 5ml의 分離培地에 接種하여 30°C 에서 10시간 배양한 菌체를 seed 로 사용하여 500ml 容 flask 에 注加된 100ml의 分離用培地에 接種, 30°C 에서 一夜 振盪培養 했다.

(4) No I-3-2菌株의 同定

供試菌株로 選定한 No I-3-2菌株의 形態學的 性質, 및 生理學的 性質의 檢討는 主로 Manual of microbiological methods⁽¹⁷⁾에 準해서 行하였으며 이들 菌學的 諸性質을 基礎로 하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁽¹⁸⁾와 駒形⁽¹⁹⁾의 好氣性 細菌의 同定法等の 分類基準를 참조해서 同定하였다.

(5) 粗酵素液의 調製

分離用培地 100ml 에 供試菌株를 接種 하여 30°C 에서 一夜 振盪培養하고 培養液을 遠心分離하여 集菌하고 蒸溜수로 一回 洗滌한 菌體를 10^{-3} M pyridoxal phosphate, 10^{-4} M EDTA 및 10^{-3} M β -mercaptoethanol 을 포함하고 있는 0.05M potassium phosphate buffer (pH7.0) 15ml 에 현탁시켜 15Kc, 5~8分間 超音波處理를 行하여 菌體를 破碎한후 遠心分離(13,000rpm; 10分)하여 細胞와 cell debris 를 除去 함으로서 酵素抽出液을 얻었다.

(6) 酵素活性의 測定.

L-cysteine HCl 10μ mole, potassium chloride 100μ mole, pyridonal phosphate 0.4μ mole 및 Tris buffer (pH9.0) 200μ mole 을 포함하고 있는 反應液에 全量이 4.0ml 가 되도록 酵素液을 加하고 30°C 에서 20分間 反應시킨 다음 30% trichloro acetic acid 溶液 1.0ml 를 加해 反應을 정지시키고 이때 沈澱되는 酵素蛋白質을 濾過除去하고 濾液 2.0 ml 를 取해 Fridemann and Haugen method⁽²⁰⁾에 따라 分解生成된 pyruvic acid 를 定量함으로서 酵素活性을 測定 하였으며 酵素單位는 1分間에 1μ mole 의 pyruvic acid 를 生成하는 酵素量으로 表示했다.

(7) 蛋白質 定量

酵素蛋白質은 $280m\mu$ 의 吸光度를 測定해서 定量하거나 또는 Lowry 等の 方法⁽²¹⁾에 따라 定量하

었다.

(8) L-cysteine 定址

M. K. Gaitonde의 spectrophotometric method⁽²²⁾에 따라 定量하였다.

結果 및 考察

(1) 菌株의 分離 檢索

京都大學食糧學研究所에 保存되고 있는 代表的 菌株 30餘種과 土壤分離菌 40餘種을 分離用培地 100ml에 接種, 30°C에서 10時間 振盪培養한 培養液으로 부터 菌株 各各의 粗酵素液을 調製하여 各菌株가 生産하는 cystinedesulphydrase의 活性을 測定 함으로서 cysteine 分解能을 檢索하였던 結果(table 1) 保存菌株中에서 Escherichia屬의 菌株가 大體로 높은 分解活性을 나타내고 있으나 土壤分離菌中 No I-3-2菌株가 현저히 높은 cysteine 分解能을 나타내고 있어 이菌을 供試菌株로 選定하였다.

Table 1. Formation of Cystinedesulphydrase by Bacteria.

Strain	Pyruvate μmoles/20min
Escherichia coli Crooks	3.18
K12	1.14
Aerobacter aerogenes	1.02
cloacae	0.32
Serratia marcescens	0.64
Proteus vulgaris	0
Proteus rettgeri	0.87
Alcaligenes faecalis	2.99
Achromobacter polymorph	0
superficialis	0
Flavobacterium arborescens	0
Bacillus megaterium	0
natto	0.64
subtilis	0
Agrobacterium tumefaciens	2.7
Micrococcus flavus	0.90
luteus	0.34
roseus	0.95
Staphylococcus aureus	0
Sarcina aurantiaca	0
lutea	2.13
lutea	2.75
marginata	0
variabilis	0

Corynebacterium aqu	0.11
Arthrobacter simplr	0.03
Brevibacterium ammoniagenes	0.50
Pseudomonas fluorescens	0.34
I-3-2	4.91
II-2	3.78
VI-2	1.51
VII-1	1.67
X-1-2	1.155
XI-1	1.67

The cell extract was prepared as described in "Experimental". Incubation was carried out under the standard assay conditions. The amount of pyruvate formed was determined with deproteinized filtrate according to the method of Friedemann and Haugen.⁽²⁰⁾

(2) No I-3-2菌株의 菌學的 性質

A. 形態學的 性質

肉汁培地에서 30°C, 10時間, 혹은 肉汁寒天培地에서 30°C, 48時間 培養시킨 No I-3-2 菌體에 對한 현미경觀察 結果 및 肉汁培地에 30°C, 10時間 振盪培養한 菌體의 電子현미경사진에 依하면 No I-3-2菌株의 세포形態는(Fig. 1). 周鞭毛에 依해 運動性을 나타내는 0.5~1.1×1.1~1.7의 크기를 가진 短桿菌으로서 Gram 陰性으로 나타났다.

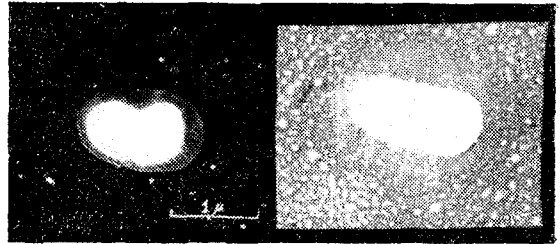


Fig. 1. Electron Micrograph of the Strain I-3-2 grown at 30°C 10 hrs. in Bouillon Medium. Short rods with rounded ends, 0.5 to 1.1 by 1.1 to 1.7 microns. Gram-negative. Occuring singly. Motile by means of peritricous flagella.

Table 2. Characteristic of the Surface Colonies of the Strain No I-3-2 on Bouillon Agar Medium.

Growth	abundant
Shape	circular
Surface	smooth, moist
Color	porcelain-white
Opacity	opaque
Pigment	no soluble pigment
Edge	entire
Elevation	convex

또한 肉汁寒天平面培地에 30°C, 48時間 培養했을 때의 No I-3-2菌株의 Colony形態는 table 2와 같다.

B. 生理學的 性質
 主로 Manual of microbiological methods⁽¹⁷⁾에 따라 No I-3-2 菌株의 各種 生理學的 性質을 조사한 결과는 Table 3. 과 같다.

Table 3. Physiological Properties of the Strain No. I-3-2.

Litmus milk test	acid with coagulation
Indole production	positive
Hydrogensulfide production	negative*
Methyl red test	negative
Voges-Proskauer test	positive
Nitrate reduction	positive
Nitrate respiration	positive
Catalase production	positive
Cytochrome oxidase production	positive
Decomposition of urea	positive
Gelatin liquefaction	negative
Nucleoside phosphotransferase	production of 5'-nucleotide
Citrate utilization	positive
Malonate utilization	positive
O-F test	fermentative
Oxygen relation	aerobic, facultatively anaerobic
Optimum temperature	around 30°C
Optimum pH	7.0

* Peptone iron agar.

한편 各種糖類에 對한 No I-3-2菌株의 醱酵性을 檢討할바 table 4에 表示되어 있는바와 같이 多糖類인 starch를 除外한 거의 모든糖을 酸과 同時에 gas를 生産함으로써 分解 하였다.

Table 4. Test of Acid and Gas Productivity from Carbohydrates by the Strain No I-3-2.

Carbohydrates	Production of acid	Production of gas
	+	+
Fructose	+	+
Mannose	+	+
Galactose	+	+
Xylose	+	+
Arabinose	+	+
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Lactose	+	+
Raffinose	+	+
Dextrin	+	+
Starch	-	-
Glycerol	+	+

以上の 諸觀察 및 考察의 結果 No I-3-2 菌株는 *Aerobacter* 屬에 屬하는 菌株로 간주되어 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁽¹⁸⁾에 記載 되어 있는 *Aerobacter* 屬의 菌種과 對照해 본 結果 No I-3-2菌株는 *Aerobacter aerogenes* 近緣의 菌種으로 同定하였다.

Table 5. Effect of Inducers on Formation of Cystinedesulphydrase by the Strain No. I-3-2.

Inducer	Total protein	Total activity	Specific activity
L-Cysteine	304mg	15.6mg	0.051
L-Cystine	320	12.3	0.039
S-Methyl-L-Cys	346	7.7	0.022
L-Ser	332	11.0	0.033
O-Acetyl-L-Ser	193	7.7	0.040
None		Trace	Trace

Inducer was added at 0.2% concentration to the basal medium described in "Experimental" The Cell extract was used. Cystinedesulphydrase was assayed as described in experimental procedure.

(3) 培養條件의 檢討

A. 各種誘導劑의 誘導效果

誘導劑가 全然 添加되지 않은 基礎培地에서는 酵素生産이 거의 認定되지 않았으므로 No I-3-2菌株가 生産하는 cysteinedesulphhydrase는 誘導酵素이다. 따라서 L-cysteine 등, 몇가지 amino acid 및 其誘導體를 基礎培地에 0.2%添加하여 이들의 酵素誘導效果를 조사해 본 結果 L-cysteine이 가장 良好한 效果를 나타내었다. (table 5).

以上の 結果에서 誘導劑로서 가장 良好한 效果를 지닌 L-cysteine의 添加濃度에 따른 No I-3-2菌株의 酵素生産에 미치는 影響을 檢討하였던바 Fig. 2와 같은 結果를 얻었다. 大體로 基礎培地에 添加되는 L-cysteine의 濃度가 增加되면 酵素生産量 역시 增加되는 傾向을 보이고 있으나 添加量이 0.2%以上인 경우에는 酵素生産量의 增加率이 極히 微微함으로 0.2%添加時가 가장 효과적이라고 생각된다.

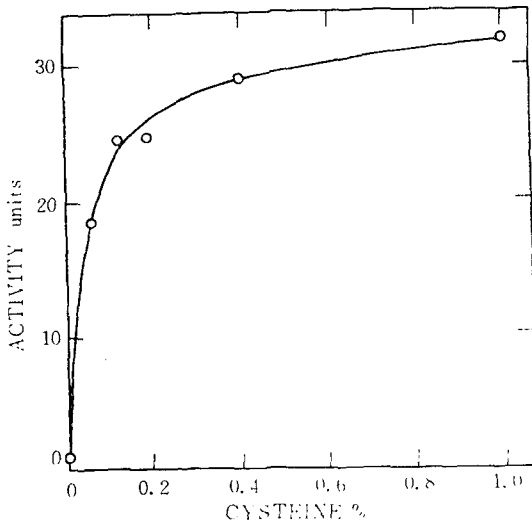
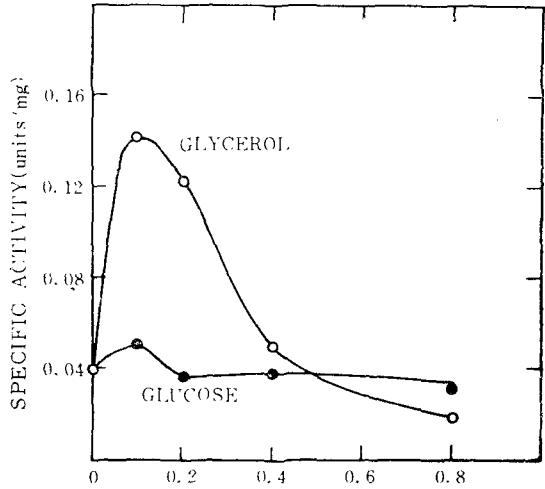


Fig. 2. Effect of L-cysteine Concentration on Enzyme formation. NoI-3-2 Strain was inoculated into 100ml of the basal medium supplemented with various concentration of L-cysteine-HCl. Cultivation was carried out at 30°C for 10 hours with reciprocal shaking. The cysteinedesulphhydrase activity was determined with the cell extracts and expressed as total units.

B. 炭素源으로서 glucose 및 glycerol의 添加效果

炭素源으로서 glucose 및 glycerol을 基礎培地에 添加하여 그添加濃度에 따른 No I-3-2菌株의 酵素生産에 미치는 效果를 조사하였다. (Fig. 3)



CONCENTRATION OF CARBOHYDRATES(%)

Fig. 3. Effect of Glucose and Glycerol on Enzyme formation by the Strain No. I-3-2.

No I-3-2 strain was inoculated into 100ml of the basal medium supplemented with various concentration of glucose and glycerol as a carbon source. Cultivation was done at 30°C for 10 hours with reciprocal shaking. The cysteinedesulphhydrase activity was determined with the cell extracts and expressed as specific activity.

G. Guarneros 등의 報告⁽⁹⁾에 依하면 S. typhimurium의 경우 炭素源으로 glucose를 0.2%培地에 添加하면 cysteinedesulphhydrase의 活性이 迅速히 誘導되었으며 glycerol 역시 같은 效果를 나타내었으나 酵素活性은 glucose 添加時의 約 1/3程度 이었다고 하며 E. Coli의 경우에 있어서는 S. typhimurium에서 보다 더욱 迅速한 酵素活性誘導效果를 나타내었으며 glycerol minimal medium에 있어서도 glucose와 거의 同等한 效果를 나타내었다고 하나 本實驗에 있어서는 一般的으로 glycerol 添加時가 glucose 보다 훨씬 良好한 結果를 보였으며 특히 glycerol을 0.1% 添加하였을 때는 현저히 높은 酵素活性을 나타내어 같은 濃度의 glucose 添加時 보다 約 3倍 程度의 酵素生産 效果를 나타내었다.

C. 培地의 最適 pH 檢討

基礎培地에 誘導劑로서 0.2%의 L-cysteine-HCl와 炭素源으로 0.1%의 glycerol을 添加한 initial PH가 各各다른 培養培地100ml에 No I-3-2 菌을 接種, 30°C에서 10時間 振盪培養하여 粗酵素液을 얻고 이들 酵素液에 對한 total protein, total activity 및 specific activity를 測定하고 培養終了後

培養液의 최종PH를 測定해서 酵素生産에 미치는 培地の PH 영향을 調査한 結果 table 6에 表示되어 있는바와 같이 initial PH가 7.0~7.5일때 가장 良好한 結果를 나타내었다.

Table 6. Effect of pH of the Medium on Enzyme Formation.

Initial pH	Total protein	Total activity	Specific activity	Final pH
6.0	464mg	15.8	0.0345	7.29
6.5	373	14.1	0.0375	7.34
7.0	330	16.2	0.0533	7.58
7.5	332	17.7	0.0503	7.56
8.0	351	13.1	0.0382	7.66

To the basal medium glycerol was added at 0.1% concentration as a carbon source. Cells were grown at 30°C for 10 hours with reciprocal shaking. Cystinedesulphydrase was assayed with the cell extracts as described in "Experimental"

D. Calcium 鹽의 添加效果

Calcium 鹽을 비롯하여 몇가지 無機鹽을 炭素源으로 glycerol을 添加한 基礎培地에 0.2%의 濃度로 添加하여 酵素生産效果를 檢討한바 CaCl₂ 添加時 良好한 結果를 얻어 CaCl₂의 添加濃度에 따른 酵素生産效果를 調査하였다. Fig. 4에 表示되어 있는 바와 같이 CaCl₂ 0.2% 添加時가 가장 良好한 效果를 나타내었다.

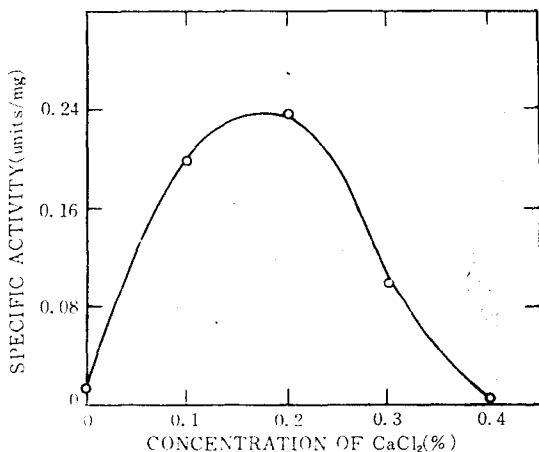


Fig. 4. Effect of Calcium Chloride on Enzyme formation by the Strain I-3-2.

To 100ml of the basal medium supplemented with glycerol (0.1%, W/V), calcium chloride was added at various concentrations. Cells were grown at 30°C for 10 hours with reciprocal shaking. The cystinedesulphydrase activity was determined with the cell extracts and expressed as specific activity.

以上の 몇가지 培養條件을 檢討한 結果를 綜合하여 table 7과 같은 組成의 酵素生産이 보다 우수한 培養培地를 얻었으며 이는 「實驗方法」에 記述되어 있는 分離用培地의 경우 보다 約2倍 以上の 酵素生産效果를 나타내었다.

Table 7. Composition of the Culture Medium.

L-Cysteine HCl	0.2%
Glycerol	0.1
Calcium chloride	0.2
Yeast extract	0.3
Meat extract	0.5
Poly peptone	0.5
NaCl	0.2

PH 7.5

E. 培養時間과 酵素生産과의 關係

Table 7에 表示되어 있는 組成의 培養培地에 No I-3-2 菌을 接種, 30°C에서 16時間 培養하면서 培養時間의 經過에 따른 菌體增殖中の 酵素活性의 變化를 每4時間 間격으로 菌體增殖量, 培養液中的 L-Cysteine 殘存量 및 酵素活性을 測定하여 檢討하였던 바 Fig. 5와 같은 結果를 얻었다.

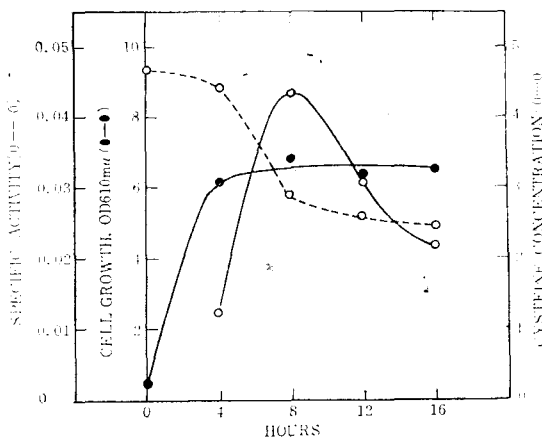


Fig. 5. Change of Cystinedesulphydrase activity during cell growth. Cell growth was expressed as optical density at 610mμ, and L-Cysteine concentration as μ mole per ml of the medium.

Fig. 5에 表示된바와 같이 酵素活性은 菌體增殖의 logarithmic phase가 거의 終了된 段階 즉 培養 8時間 前後에서 현저히 높았으며 誘導劑로 添加된 L-cysteine 역시 培養後 4時間에서 부터 8時間 사이에서 가장 急激하게 消費됨을 볼 수 있으며 그 以後에서는 酵素誘導劑의 소비량이 極히 減少됨과 同時 酵素活性도 急激히 減少되고 있어 約 8

時間 程度의 培養時間이 가장 效果的 이라고 생각 된다

要 約

1. 約 70餘種의 保存 및 土壤分離菌에서 cysteine 分解能이 큰 새로운 菌株을 分離檢索 하였던 바 cysteine 分解能이 가장 높았던 土壤分離菌株인 No. I-3-2 를 供試菌株로 選定하여 이 菌株에 對한 菌學的 諸性質을 檢討한 結果 No. I-3-2 菌株은 *Aerobacter aerogenes* 로 同定되었다.

2. No I-3-2 菌株은 L-cysteine 을 cysteinedesulhydrase 生産의 가장 效果的인 誘導劑로 必要로 하였으며 또한 本菌의 酵素生産을 위한 몇가지 培養條件을 檢討한 結果 培養培地의 initial PH가 7.0~7.5 일때, 炭素源으로 glycerol 을 0.1%, 無機鹽으로 CaCl₂ 를 0.2% 濃度로 基礎培地에 添加하였을때 가장 良好한 酵素生産效果를 나타내었고 培養時間은 培養 8時間前後에서 菌體增殖 및 酵素生産의 最大値를 나타내었다.

謝 意

이 研究를 遂行함에 있어 始終 指導해 주신 京都大學食糧科學研究所 山田秀明 教授에게 感謝드리며 아울러 電子顯微鏡 사진 촬영에 協力해주신 京都大學化學研究所 關係研究員 여러분께 充心으로 감사 를 드립니다.

PEFERENCES

1. Tarr, H. L. A. : Biochem. J. **27**, 1864-1874 (1933)
2. Fromogeot, C. and Desnuelle, P. : Enzymologia **6**, 80-87 (1940)
3. Desnuelle, P. Wookey, E. and Fromogeot, C. : Enzymologia. **8**, 225-240 (1940)
4. Fromogeot, C. Wookey, E. and Chaix, P. : Enzymologia. **9**, 198-214 (1940)
5. Smythe, C. V. : J. Biol. Chem. **142**, 387-400 (1942)
6. Smythe, C. V. : Advances Enzymol. **5**, 237-247 (1945)
7. Kallio, R. E. and Porter, J. R. : J. Bacteriol. **60**, 607-615 (1950)
8. Fromogept, C. : The Enzymes. Vol. 5, Part 2, 1237-1243, Academic Press, New York. (1951)
9. Guarneros, G. and Ortega, M. V. : Biochim. Biophys. Acta. **198**, 132-142 (1970)
10. Collins, J. M. : ph. D. Dissertation, Tennessee (1956)
11. Nicholas, M. K. Bruce, S. K. and Linda, J. F. : J. Biol. Chem. **22**, 7157-7162 (1972)
12. Yamada, H. Kumagai H. Kumagai, H. Kashima, N. Torii, H. Enei, H. and Okumura, S. : Biochem. Biophys. Res. Commn. **46**, 370-374 (1972)
13. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, H. and Ogata, K. : J. Biol. Chem. **245**, 1767-1772 (1970)
14. Kumagai, H. Matsui, H. Okkishi, K. Yamada, H. Ueno, T. and Fukami, H. : Biochem. Biophys. Res. Commn. **34**, 266-270 (1969)
15. Ueno, T. Fukami, H. Ohkishi, H. Kumagai and Yamada, H. : Biochem. Biophys. Acta. **206**, 476-479 (1970)
16. Watanabe T. and Esmond. E. Snell. : Proc. Nat. Acad. Sci. **69**. 1086-1090 (1972)
17. Manual of microbiological methods. McGraw-Hill Book Co. (1957)
18. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Edition, The Williams and Wilkins Co. (1957)
19. 駒形和男, 化學と生物, **10**, 332-341 (1972)
20. Friedmann, T. E. and Haugen, G. E. : J. Biol. Chem. **147**, 415 (1943)
21. Lowry, O. H. Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. : J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951)
22. Gaitonde, M. K. : Biochem. J. **104**, 627 (1967)