

## 微生物에 의한 5'-이노신酸的 生産에 관한 研究

(第 1 報) 5'-이노신酸 生産菌株의 分離

襄鍾燾 · 孔雲泳 · 孫忠弘 · 張 旭 · \*柳洲鉉

第一製糖株式會社 食品研究所 · \*延世大學校 食品工學科  
(1979년 3월 5일 수리)

## Studies on the Fermentative Production of Inosine- 5'-monophosphate by Microorganisms

(Part 1) Derivation of 5'-IMP Producing Mutants from  
*Brevibacterium ammoniagenes*

Chong Chan Bae, Un Young Kong, Choong Hong Son, Uk Chang and Ju Hyun Yu

Cheil Sugar Co. Ltd., Food R. and D. Center, \*Department of Food Engineering, Yonsei  
University, Seoul, Korea  
(Received March 5, 1979)

### Abstract

As the first step of domestic developmint of the nucleic acid-related compounds, purine base required auxotrophs from *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 were derived by the ultraviolet irradiation or the treatment of N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (NTG), diethyl sulfate (DES), and ethylmethyl sulfate (EMS).

The optimum conditions of mutation by means of several mutagens were induced respectively. The yield of mutants was 0.083% by the ultraviolet irradiation, 0.67% by the NTG treatment, 1.1% by the DES treatment, and 0.45% by the EMS treatment.

Six strains among 239 auxotrophs were screened out to accumulate 5'-IMP in the culture broth. Crystalline 5'-IMP was isolated from the culture broth of *Brevifbacterium ammoniagenes* adenine-guanine less mutant D-21530 by the use of anion exchange resin, Amberlite IRA-402, and it was identified physically and chemically as 5'-inosinic acid.

### 緒 論

核酸關聯物質의 生産에 관한 研究는 과거 20여 년간 日本을 비롯한 세계 각국에서 활발히 진행되어 오면서 수많은 研究論文이 報告되어 왔다<sup>(1~11)</sup>. 지금까지 알려진 대표적 製造方法을 보면 魚肉類 物質에서의 抽出方法, 酵母核酸 分解方法<sup>(4,5)</sup>, 微生物에 의한 醱酵方法<sup>(6~10)</sup>, 合成法<sup>(11)</sup>, 등이 있으며 이중 工業적으로 사용되는 製造法은 酵母核酸 分解方法과 微生物을 利用한 醱酵方法을 들수

있다. 또한 醱酵法 중에서도 Nucleoside를 발효한 후 다시 酵素 또는 化學的 方法으로 인산화하는 半醱酵半合成法<sup>(8,9)</sup>과 糖質에서 직접 배양액중에 축적시키는 直接醱酵法<sup>(7,10)</sup>이 현재 工業化되어 있다.

이러한 醱酵法에 의한 핵산관련물질의 生産은 미생물의 핵산관련물질 de novo 합성경로상 어느 한 부위의 효소적 결함을 變異劑(Mutagen)에 의하여 인위적으로 유도함으로써 酵素缺陷 전단계의 물질을 蓄積한다는 사실이 알려져 있으며<sup>(12,13)</sup>, 이러한 사실을 기초로 한 purine auxotroph 분리방법 또한 공식화되어 있는 실정이다.

국내에서도 이미 1969년 金등<sup>(14)</sup>에 의한 adenine 營養要求株의 分離에 관한 연구가 보고된바 있고, 1972년에는 裴등<sup>(15,16)</sup>이 *Brevibacterium ammoniagenes* 에서 adenine 영양요구주를 분리하고 그 生産物을 分離同定하여 5'-이노신산임을 확인하는등 直接酶法에 대한 일련의 연구가 보고된바 있다.

본보에서는 調味料으로써 뿐만아니라 醫藥用 및 生化學物質으로써 중요한 5'-이노신산등 핵산관련물질의 國內生産을 목적으로 *Brevibacterium ammoniagenes* 에서 각종 purine 영양요구주를 분리하고 突然變異 發生狀態를 分析하였다. 그중 몇몇 번이주가 배양액중에 현저한 量의 5'-이노신산을 직접 分비추적하였음을 확인하였기에 그 結果를 工業的 生産의 기초적 자료로서 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### (1) 使用菌株

*Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 를 親株로 사용하였다.

### (2) 培地組成

영양요구변이주 분리에 사용한 배지는 meat extract 1.0%, yeast extract 0.3%, peptone 1.0%, NaCl 0.3% 및 agar 2.0%의 nutrient medium 을 完備배지 (complete medium; C)로, 그리고 Misawa<sup>(17)</sup> 등이 사용한 Minimal medium 을 약간 변형한 glucose 2.0%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 10mg/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1mg/L, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 1mg/L, L-Cysteine 20mg/L, Ca-Dpantothenate 10mg/L, thiamine·HCl 5mg/L, biotine 30μg/L, ueea 0.2%, casamino acid, vit-free 0.1% 을 최소배지 (MM)로 하여 여기에 adenine, guanine 을 각각 10mg/L 되게 첨가하여 첨가배지 (supplemented medium; S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>)로 사용하였다. 각 배지는 NaOH 로 살균전 pH 7.3 으로 조절한후 120°C 에서 20분간 가압살균하여 사용하였다.

### (3) Purine 영양요구주 분리방법

영양요구주 분리방법은 Lichstein 등<sup>(18)</sup>의 變異法을 기본방법으로 하여 Fig. 1 에서 보는 바와같이 친주인 *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 를 최소배지에 一夜 activation 시킨후 균체를 모으

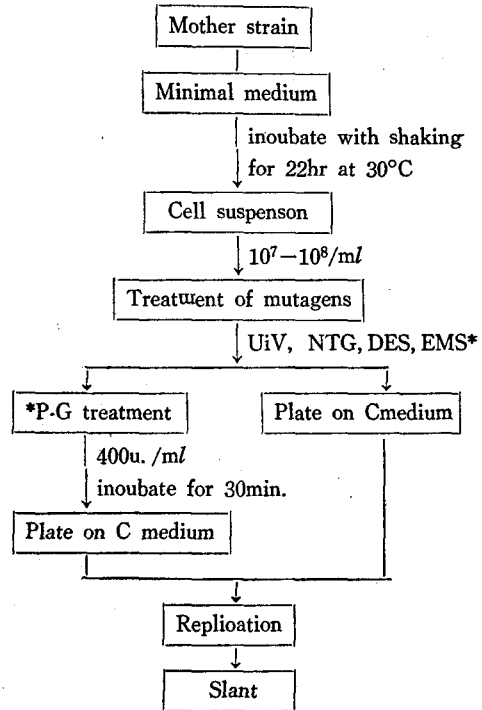


Fig. 1. Process of Auxotrophs Isolation

고 이를 생리식염수로 2~3회 무균적으로 세척하여 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> cells/ml 되게 희석한 균체현탁액을 시료로 하였다.

UV 照射는 균체현탁액 20 ml 를 petri dish (φ120 mm)에 넣어, 사용 30분전에 安定化시킨 UV 燈 (15W, 2537Å)의 수직방향에 거리 20~60cm, 조사시간 30~120초로 각 조건에서 조사한후 dark place 에서 1시간 경치하여 C배지에 plating 하였다. 또한 NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine), DES (diethyl sulfate) 및 EMS(ethylmethyl sulfate)등의 변이처리제도 각각의 농도, 처리시간 별로 상온에서 처리한후 균체를 모으고 생리식염수로 2~3회 무균적으로 균체를 세척한후 적당히 희석하여 C배지에 plating 하였다. 30°C 에서 40~48시간 배양하여 생성된 colony 는 Lederberg 방법<sup>(19)</sup>에 따라 첨가배지 S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>에 replication 하여 purine 영양요구주를 분리하였다. 또한 Davis 등의 방법<sup>(20)</sup>에 의하여 penicillin-G (P-G) 처리방법을 병용하였고 필요에 따라 반복 처리하였다.

### (4) 分析方法

핵산관련물질의 定性 및 定量은 paper chromatography 法<sup>(21)</sup>과 column chromatography 法<sup>(22)</sup>을 사

용하였고, 분리정제된 5'-이노신산나트륨은 ultra-violet spectrum, infra-red spectrum, D-ribose 정량 및 orcinol 반응<sup>(23)</sup> 등을 이용하여 최종적으로 확인하였다.

## 結果 및 考案

### (1) Purine 營養要求株의 分離

(가) Purine 營養要求株의 Growth Response  
*Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 를 천주 로하여 각종 變異誘起劑를 처리한후 C배지에서 생육한 colony 를 M배지 및 S배지에 replication 하여 각배지에서의 생육여부를 조사한 결과 Table 1 과 같다.

영양요구성은 재차 액체배지에서 24시간 진탕배 양하여 확인하였으며, adenine 첨가 최소배지에서 생육하는 것은 adenine 요구주, guanine 첨가 최소 배지에서 생육하는 것은 guanine 요구주, adenine-guanine 동시첨가 최소배지 생육하는 것은 adenine-guanine 동시요구주로, 그리고 adenine 이나 guanine 중 어느 하나만 첨가한 최소배지에서 생육하는 것은 purineless 변이주로 하였다.

Table 1. Growth Responses of Auxotroph Mutants,

| Genotype                          | Addition growth |                |                |                |   |
|-----------------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---|
|                                   | MM              | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | C |
| Parant*                           | +               | +              | +              | +              | + |
| Ad <sup>-</sup>                   | —               | +              | —              | +              | + |
| Fu <sup>-</sup>                   | —               | —              | +              | +              | + |
| Ad <sup>-</sup> , Gu <sup>-</sup> | —               | —              | —              | +              | + |
| Pur <sup>-</sup>                  | —               | +              | +              | +              | + |

\**Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872

S<sub>1</sub> : MM+Ad

S<sub>2</sub> : MM+Gu

S<sub>3</sub> : MM+Ad&Gu

+ : growth

— : no growth

### (나) 각종 變異誘起劑의 最適處理條件

핵산관련물질 생산균주를 효율적으로 분리하기 위하여 UV 조사 및 NTG, DES, EMS 등을 여러 가지 조건하에서 사멸율 및 변이율을 검토한 결과 Table 2 와 같은 최적처리조건을 구하였다.

일반적으로 핵산관련물질 생산균주의 분리에는 UV, X-ray 등의 단파장 조사나, NTG, DES 등의 alkylating agents 가 많이 사용되며 본연구에서도

Table 2. Optimum Conditions of Mutation with four Mutagens to obtain Auxotroph Mutants.

| Mutagens | Conditions         | Killing rate, % | Mutation rate, % |
|----------|--------------------|-----------------|------------------|
| UV       | 30 cm, 1 min.      | 99.986          | 0.083            |
| NTG      | 200 µg/ml, 20 min. | 72.5            | 0.67             |
| DES      | 0.32 %, 90 min.    | 99.44           | 1.1              |
| EMS      | 5.0 %, 60 min.     | 87.32           | 0.45             |

NTG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

DFS : Diethyl sulfate

EMS : Ethyl methyl sulfate

Mutation rate : Percentage of the number of auxotrophs against that of isolated cells

DES 가 Mutation rate 1.1%로 가장 양호하였고 NTG, EMS, UV 순으로 낮았다. 이러한 경향은 Misawa<sup>(17)</sup>나 襄登<sup>(15)</sup>의 결과에서도 볼수 있으나, 다소 높은 變異率을 나타내고 있다. 또한 死滅率의 경우 UV 조사나 DES 처리의 경우 99%이상 높은 조건하에서 Mutation rate 가 좋았으나, NTG 나 EMS 처리의 경우는 오히려 死滅率이 높을 경우 낮은 變異率을 보이는 경향은 특기할 만한 일이었다. 그리고 penicillin-G 처리법사용은 變異率 이 증가하는 경향은 확실하였으나 일관성있는 재현성은 나타나지 않았다.

획득한 변이주중 變異誘起劑의 종류에 따라 영양요구성의 분포를 조사한 결과 Table 3 에서 보는 바와같이 총 239주중 69%인 165 주가 adenine 요구주였고 adenine-guanine 동시요구주는 7주로써 2.9%밖에 안되었으며 non-exacting purine영양 요구주가 41주로 adenine 요구주 다음으로 많았다.

Table 3. Isolation of Puriniess Mutants from *Brev. ammoniagenes*.

| Mutagens | Number of colonies tested | Number of mutants appeared |                 |                                   |         |
|----------|---------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------------------|---------|
|          |                           | Ad <sup>-</sup>            | Cu <sup>-</sup> | Ad <sup>-</sup> , Gu <sup>-</sup> | Unknown |
| UV       | 44,578                    | 11                         | 2               | —                                 | 24      |
| NTG      | 8,358                     | 45                         | 7               | 1                                 | 3       |
| DES      | 9,909                     | 83                         | 13              | 4                                 | 9       |
| EMS      | 8,222                     | 26                         | 4               | 2                                 | 5       |

Treatment condition of mutation is same as table 2.

變異誘起劑 종류별로 보면 UV 조사의 경우 non-exacting purine 영양요구주가 많이 발생한 반면 기타 Mutagen 들은 비슷한 경향을 보였다.

(2) Purine 營養要求株에 의한 核酸關聯物質의 生成

최득한 purine 영양요구주 129 주를 30 ml 의 발효 배지를 넣은 500 ml 진탕용 삼각 flask 에 접종하여 4~6 일간 진탕 배양한 후 배양여액을 paper chromatography 법 및 column chromatography 법으로 생성물을 확인, 정량한 결과 53 주가 자외선 흡광물질을 생성하였으며, adenine 영양요구주는 hypoxanthine 系 物質을, guanine 영양요구주는 xanthine 系 物質을, 그리고 adenine-guanine 동시영양요구주는 hypoxanthine 系 혹은 xanthine 系 物質을 생성하였다.

이중 5'-이노신산을 생성하는 변이주는 6 주뿐이었으며 (Table 4), 대부분 Inosine 과 hypoxanthine 을 副生하였으나 adenine-guanine 동시요구주인 D-21530은 5'-이노신산만을 상당량 축적하였다.

Table 4. Some Auxotrophs Derived from *Brev. ammoniagenes*

| Auxotrophs | Genotype                          | Mutagens | 5'-IMP·Na <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O (mg/ml) |
|------------|-----------------------------------|----------|---|
| U-458      | Ad <sup>-</sup>                   | UV       | 1.7   |
| N-346      | Ad <sup>-</sup>                   | NTG      | 2.2   |
| N-653      | Ad <sup>-</sup>                   | NTG      | 2.1   |
| D-10035    | Ad <sup>-</sup>                   | DES      | 2.4   |
| D-21530    | Ad <sup>-</sup> , Gu <sup>-</sup> | DES      | 4.8   |
| E-367      | Ad <sup>-</sup>                   | EMS      | 1.3   |

Fermentation medium: 10%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01%, meat extract 0.5%, yeast extract 0.5%, thiamine·HCl 5mg/L, adenine 30mg/L, guanine 30mg/L, urea 0.6%, pH 8.3 with NaOH

Cultivation was carried out 4 days with shaking at 30°C.

5'-이노신산의 생성균주는 대부분 adenine 영양요구주으로써 5'-IMP 에서 5'-AMP 로 가는 단계의 adenylosuccinate synthetase 가 저해 되므로써 adenine 을 생육에 요구하게 되며 5'-XMP 를 거쳐 생성된 5'-GMP 가 IMP-dehydrogenase 를 feed back inhibition 하므로써 5'-IMP 가 축적된다고 알려져

있다<sup>(24)</sup>. 그러나 adenine-guanine 동시요구주는 5'-IMP 보다는 5'-XMP 를 더 많이 생성하는 경우가 많았으며 어떤 변이주는 5'-IMP 와 5'-XMP 를 동시에 축적하는 것도 있다고 보고된 바와같이<sup>(17)</sup>, adenine 이나 guanine 단독요구주에 비하여 유동적인 면이있는 것으로 추측된다. 이러한 생성물의 변화는 adenine-guanine 동시요구성이 변이주 분리 방법상 adenine 과 guanine 을 요구할뿐 실질적으로 adenine 과 xanthine 을 요구할 때에는 5'-IMP 를 축적하고 adenine 과 guanine 을 요구할 때에는 5'-XMP 또는 5'-IMP 와 5'-XMP 를 혼합생성하는 것으로 사료된다.

(3) adenine-guanine 同時營養要求株 D-21530 的인 生成物質의 分離同定

Table 4 의 5'-IMP 생산균주중 가장 양호하였던 D-21530 strain (adenine-guanine 동시요구주)을 glucose 10%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01%, meat extract 0.5%, yeast extract 0.5, thiamine·HCl 5mg/L, adenine 30 mg/L, guanine 30 mg/L, urea 0.6%의 발효배지에 30°C에서 4일간 배양하여 얻은 발효액을 Fig. 2의 방법에 따라 5'-IMP 결정을 얻었

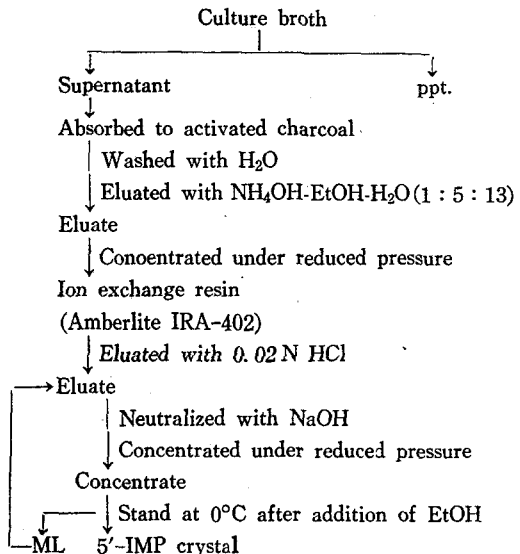


Fig. 2. Isolation Procedure for Obtaining 5'-IMP

다. 이결정을 100°C에서 감압건조하여 무수물을 만든 후 원소분석한 결과 C 30.4%, H 3.4%, N 14.3%, O 32.5%, P 7.8%, Na 11.6%로 理論値와 거의 동일하였다.

**Table 5.** Rf-Values of Crystalline IMP Isolated from *Brev. ammoniagenes* D-21530.

| Solvent          | I    | II   | III  | IV   | V    |
|------------------|------|------|------|------|------|
| Sample           | 0.28 | 0.17 | 0.19 | 0.24 | 0.55 |
| Authentic 5'-IMP | 0.28 | 0.16 | 0.19 | 0.25 | 0.55 |
| 3'(2')-IMP       | 0.34 | 0.21 | 0.22 | 0.27 | 0.64 |
| 5'-XMP           | 0.24 | 0.14 | 0.15 | 0.21 | 0.43 |
| 5'-GMP           | 0.23 | 0.13 | 0.16 | 0.20 | 0.44 |
| Adenosine        | 0.60 | 0.45 | 0.45 | 0.33 | 0.58 |
| Adenine          | 0.95 | 0.80 | 0.85 | 0.61 | 0.81 |
| Hypoxanthine     | 0.74 | 0.56 | 0.53 | 0.52 | 0.64 |

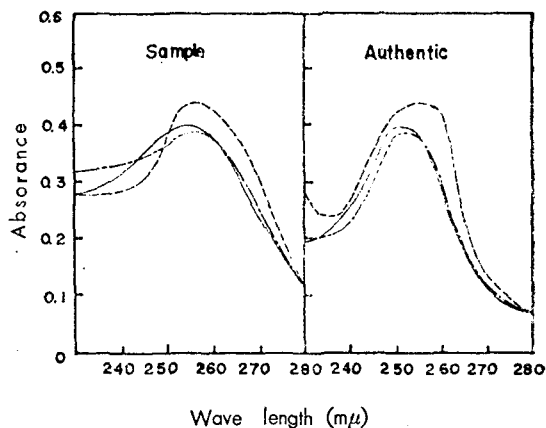
Solvent I : Isobutyric acid-acetic acid-1 N NH<sub>4</sub>OH (10 : 1 : 15)

II : Isobutyric acid-EtOH-1 N NH<sub>4</sub>OH (10 : 3 : 5)

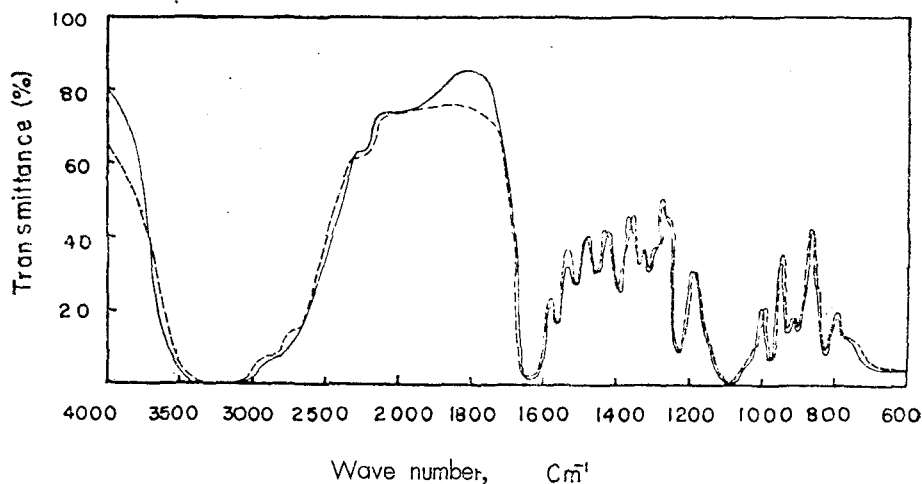
III : Isobutyric acid-ethylacetate-1 N NH<sub>4</sub>OH (10 : 2 : 5)

IV : EtOH-c. NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (50 : 25 : 25)

V : MeOH-c. NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (60 : 10 : 30)



**Fig. 3.** UV Absorption spectra of Crystalline IMP Isolated from Culture Broth of *Brev. ammoniagenes* D-21530.  
 ---- Alkaline (pH 11.0)  
 ——— Neutral (pH 7.0)  
 -.-.- Acid (pH 1.0)



**Fig. 4.** IR Spectrum of Crystalline IMP Isolated from Culture Broth of *Brev ammoniagenes* D-21530.

— Sample, ---- Authentics

Sample: in KBr water,

**(가) paper chromatogram 의 Rf 値**

본결정 일정량을 증류수에 용해하여 1mg/ml 의 수용액을 만들어 Whatman no.2 chromatographic paper 에 spotting 한후 각종 전개제를 사용하여 상온에서 상승법으로 전개시켜 표준품과 비교한 결과 Table 5 와 같다. 5'-nucleotide 중 5'-IMP 와

5'-GMP 는 서로 명확한 분리가 곤란하나 5'-IMP 는 비교적 他核酸關聯物質과의 구별이 용이한 편이었으며 3'-IMP 나 2'-IMP 와도 판별할수 있었다. 또한 5'-nucleotide 임을 확인하기위해 과요소산산화반응<sup>(25)</sup>을 보았을때 청색을 띠는 것으로 보아 본결정은 5'-이노신산 임을 확인할수 있었다.

(나) 자외선 및 적외선 흡수 spectrum

분리한 결정품을 1% 수용액으로 하여 자외선 흡수 spectrum 을 조사한 결과 산성 및 중성에서는 240 m $\mu$  에서, 그리고 알카리성에서는 252 m $\mu$  에서 최대흡광치를 나타내었으며 이것은 표준품의 흡수 spectrum 과 거의 일치하였다(Fig. 3).

또한 Fig. 4에서 보는바와 같이 적외선 흡수 spectrum 에서도 표준품과 거의 동일한 흡수대를 나타냄을 알수 있었다.

(다) Hypoxanthine 및 D-Ribose 의 定量

분결정 일정량을 2N HCl 로 100°C 에서 1 시간 가수분해하여 생성한 hypoxanthine 량을 Dowex 1

**Table 6.** Hydrolysis with 2N HCl of Crystalline 5'-IMP Isolated from Culture Broth of *Brev. ammoniagenes* D-21530

| Sample | 2N HCl | Hydrolysates ( $\mu\text{g/ml}$ ) |         |        |
|--------|--------|-----------------------------------|---------|--------|
|        |        | Hypoxanthine                      | Inosine | 5'-IMP |
| +      | -      | 0                                 | 0       | 995    |
| +      | +      | 302                               | 0       | 0      |

The hydrolysates were identified by its paper chromatograms, and measured by column chromatographic method on Dowex 1 $\times$ 4 (formate column).

**Table 7.** Determination of D-Ribose in Crystalline 5'-IMP by Orcinol Reaction.

| Sample                         | 1     | 2     | 3   |
|--------------------------------|-------|-------|-----|
| D-Ribose, $\mu\text{g}$ (A)    | 230   | 464   | 681 |
| Theoretical, $\mu\text{g}$ (B) | 234.7 | 468.6 | 702 |
| A/B $\times$ 100               | 98    | 99    | 97  |

The content of D-ribose of serial diluents of the sample was measured by the method of orcinol reaction.

$\times$ 4, formate column 을 사용하여 정량한 결과 분결정 1mole 당 hypoxanthine 0.97mole 이 생성하였으며(Table 6), 또한 orcinol 반응에 의한 D-ribose 생성량을 정량한 결과 이론치의 98 % 정도 생성되었다(Table 7).

따라서 *Brev. ammoniagenes* ATCC 6872 에서

유도한 adenine-guanine 동시요구주 D-21530 의 배양액에서 얻은 결정은 5'-IMP 로 同定할수 있었다.

要 約

(1) 核酸關聯物質 生産菌株의 분리를 위한 變異誘起劑의 최적 처리조건은 UV; 30 cm, 1 min, NTG; 200  $\mu\text{g/ml}$ , 20 min, DES; 0.32 %, 90 min, EMS; 5 %, 60 min 이었으며 이때 變異率は 각각 0.083 %, 0.67 %, 1.1 %, 및 0.45 %로 DES 가 가장 양호하였다.

(2) Purine 영양요구변이주 239 strain 중 5'-IMP 생산균주는 모두 6 strain 이었으며 이중 adenine-guanine 동시요구주 D-2150 이 4.8 mg/ml 로 가장 우수하였다.

(3) D-21530 strain 의 배양액에서 얻은 결정을 paper chromatogram 의 Rf 치, 자외선 및 적외선 흡수 spectrum 비교, 가수분해에 의한 hypoxanthine 생성량 및 orcinol 반응에 의한 D-ribose 의 생성량을 검토한 결과 5'-IMP 로 동정되었다.

이 研究을 할때 협력하여 주신 第一製糖株式會社 김홍집 상무, 그리고 핵산의 정량분석을 하여 준 문화식 씨에게 감사드립니다.

參考文獻

- 1) A. Kuninaka: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **34**, 489 (1960).
- 2) B. Toi, S. Maeda, S. Ikeda and H. Furukawa: Proceeding of the 2nd Annual Meeting of the Kanto Section of Agr. Soc. Japan, 1960, pp. 2.
- 3) M. Kibi, Nero: *Food Ind.* (Japan), **3**, 41 (1961).
- 4) A. Kuninaka, S. Otsuka, Y. Kobayashi and K. Sakaguchi: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 239 (1959).
- 5) E. Omura and K. Ogata: Proceeding of the 2nd Annual Meeting of the Kanto Section of Agr. Chem. Soc. Japan, 1960, pp. 8.
- 6) Uohida, A. Kuninaka, H. Yoshino and M. Kibi: *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 804 (1961).
- 7) F. Kato, A. Furuya and S. Abe: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1061(1971).
- 8) T. Hara, Y. Koaze, Y. Yamada, M. Kojima, K. Sato and Y. Aoyama: *Agr. Biol.*

- Chem.*, **26**, 747 (1962).
- 9) R. Aoki: Japanese patent, 18095 (1960).
  - 10) Carpamels and Ransford: England patent, 1114084 (1968).
  - 11) T. Hashizume: KAGAKU NO RYOIKI, **14**, 702 (1960).
  - 12) Demanin, A. L., M. Jakson, R. A. Vitali, D. Hendlin and T. A. Jaob: *Appl. Microbiol.*, **14**, 821 (1966).
  - 13) Misawa, T., T. Nara and S. Kinoshita: *Amino acid and Nucleic acid*, **19**, 150 (1968).
  - 14) 金浩植, 李春寧, 李啓瑚, 金尙淳: 農化學會誌, **11**, 137 (1969).
  - 15) 袁武, 李啓準: 한국미생물학회지, **10**, 73(192).
  - 16) 袁武, 李啓準: 한국미생물학회지, **10**, 109 (1972).
  - 17) M. Misawa, T. Nara and S. Kinoshita: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 514 (1969).
  - 18) H. C. Liohstein and E. L. Oginsky: "Experimental Microbial Physiology" W. H. Freeman Co., 1965, pp. 72.
  - 19) Lederberg, J. and Lederberg, E. M.: *J. Bacteriol.*, **63**, 399 (1952).
  - 20) Davis, B. D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 4267 (1948).
  - 21) 中山 清, 奈良 高, 鈴木 武夫, 佐藤 善大, 三澤 正愛, 木下 祝都: *Amino acid and Nucleic acid*, **8**, 81 (1963).
  - 22) 古屋 晃, 阿部 重雄, 木下 祝都: *Amino acid and Nucleic acid*, **8**, 100 (1963).
  - 23) Massart, L., Hoste, J.: *Biochem. BioPhys. Acta*, **1**, 83 (1947).
  - 24) Magasanik, B. and Karibiar D.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2672 (1960).
  - 25) Dixon, J. S., Lipkin, D.: *Anal. Chem.*, **26**, 1092 (1954).