リジン発酵に関する研究(第6報)

Bacillus subtilis のリジン要求株によるジアミノピメリン酸蓄積

田中晴雄, 萩野浩志, 中山 清 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 41 年 10 月 17 日 受 理

Studies on Lysine Fermentation

Part VI. Diaminopimelic Acid Accumulation
by a Lysine-Auxotroph of *Bacillus subtilis*

By Haruo TANAKA, Hiroshi HAGINO and Kiyoshi NAKAYAMA

Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.,
Machida, Tokyo

A lysine-auxotroph of *Bacillus subtilis* was found to accumulate a significant amount of *meso*- and LL- α , ϵ -diaminopimelic acid (DAP) in its culture broth. DAP mixture containing *meso*- and LL-isomer was isolated from the culture broth using strongly acidic cation-exchange resin, Diaion SK 1 A (NH_4^+). Pure *meso*-isomer was separated from the DAP mixture by fractional precipitation using ethanol.

The amounts of lysine, phosphate and magnesium sulfate in culture medium influenced remarkably on the accumulation of DAP by the organism. The maximal concentration of DAP accumulated was 3.3 mg per ml of the culture broth. (Received October 17, 1966)

緒 言

微生物 auxotroph を用いるジアミノピメリン酸(DAP)の蓄積については *Escherichia coli* を用いる場合⁽¹⁻⁶⁾と, *Micrococcus glutamicus* を用いる場合⁽⁷⁾が報告されている。

ここでは, *Bacillus subtilis* (Ade⁻, Lys⁻) が DAP を蓄積することを見い出し, DAP を分離精製し, 培養条件についても若干検討したのでその結果について報告する。

実 験 方 法

供試菌株: とくにことわらない限り, *Bacillus subtilis* (Ade⁻, Lys⁻) KY 7526 を用いた。一部 KY 7525 を用いた。

培養法: 保存 slant より 1 白金耳をとり, グルコース 2.0%, 酵母エキス 1.0%, ペプトン 1.0%, 食塩 0.25% を含む種培地に植菌し, 30°, 24 時間振盪培養後発酵培地に 10% の割合で植菌し, 30° で 4 日間振盪培養した。発酵培地はそれぞれ表の脚註に示した。

DAP の定量: 培養液上清を 5 倍に稀釈後, Gilvarg⁽⁸⁾の方法を約 3 倍の規模に改変した方法により DAP を定量した。

実 験 結 果

I. DAP の確認および分離精製

培養液上清を Rhuland ら⁽⁹⁾のペーパークロマトグラフィ, すなわちメタノール, 10 N 塩酸, ピリジン, 水 (80:25:10:17.5) の溶媒でペーパークロマトグラフィを行なった結果, *meso*- および LL-DAP の両方が蓄積していることがわかった。

分離精製は第 1 図に示したような方法で行なった。すなわち pH 2.0 の培養液上清を, ダイヤイオン SK 1 A (NH_4^+ 型) に通塔し, 水洗後 0.05 N NH_4OH で溶出した (第 2 図)。溶出された DAP を含む分画のうち他のアミノ酸を含まない部分を濃縮し, 活性炭にて脱色後エタノールを添加して生じた沈澱を乾燥して DAP の粉末を得た。

また, エタノールを加えて DAP を沈澱させる場合に, *meso*-体と LL-体の溶解度の差でそれらを分離することを目的として, エタノールを第 1 図のように段階的に多くしていった。その結果, 1 倍量のエタノールではほとんど *meso*-DAP だけが沈澱し, 5 倍量では *meso*-体と LL-体がほぼ半量ずつ沈澱し, 最後の 10 倍量ではほとん

ど LL-DAP だけが沈澱した。なお, LL-DAP が多くなるにつれて結晶になりやすくなることがわかった。

イオン交換樹脂については, ダイヤイオン SK1A (NH_4^+ 型) の他に H^+ 型についても検討したが, H^+ 型の場合は他のアミノ酸との分離が悪く, 溶出範囲も広がり不適當であった。 NH_4^+ 型の場合は吸着もよく比較的

第1表 DAP 蓄積に及ぼす炭素源の影響

炭素源	炭素源の濃度(%)	pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
グルコース	10	7.0	3.1	2.38
	5	8.7	1.7	1.50
フラクトース	10	7.0	2.6	2.43
	5	8.6	2.4	1.57
キシロース	10	6.2	1.7	1.00
	5	6.6	2.2	1.78
ラクトース	10	8.1	3.5	0.56
	5	8.2	4.0	0.47
マンニトール	10	8.0	5.4	0.40
	5	8.0	7.2	0.40
ソルビトール	10	8.2	3.5	0.23
	5	8.8	2.8	0.17
デンプン (可溶性)	10	8.1	5.9	0.39
	5	8.8	4.3	0.29

基礎培地: KH_2PO_4 0.25%, K_2HPO_4 0.25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 酵母エキス 1.0%, アデニン 100 γ /ml, リジン 25 γ /ml, CaCO_3 1.0%, 尿素 1.0% (別に殺菌), pH 7.2.

良好な結果が得られた。すなわち, 培養液上清を通塔後, 多量の水を通すことにより, 酸性アミノ酸とイソロイシン, アラニンなどの中性アミノ酸も溶出され, DAP は 0.1 M ギ酸アンモン, または 0.05 M アンモニアで溶出することができた。 ギ酸アンモンでは tailing するので, むしろアンモニアの方が適當であると考えられる。 また終りの方の DAP-分画には少量のフェニルアラニンが含まれていた。分離した DAP は赤外吸収スペクトル⁽⁷⁾で標準品と一致した。

II. 培養条件の検討

1. 炭素源の検討

炭素源としてグルコース, 可溶性デンプン, キシロース, ラクトース, マンニトール, ソルビトール, フラクトースについて検討した。その結果, 第1表に示したように, DAP 蓄積にはグルコース, フラクトースがよく, キシロースもややよかった。また生育はマンニトール, 可溶性デンプンで良好であった。

2. 窒素源の検討

窒素源として硫酸アン

第2図 ダイヤイオン SK1A (NH_4^+ 型) による DAP の精製
レジン: ダイヤイオン SK1A (NH_4^+ 型) 3.5 l.

第 2 表 DAP 蓄積に及ぼす窒素源の影響

窒 素 源	pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
硫酸 アンモ ニウム	2.1%	4.9	2.2
	1.4	4.2	3.3
	0.7	5.0	3.5
塩化 アンモ ニウム	1.7	5.0	3.3
	1.14	5.0	3.1
	0.57	5.0	3.2
尿 (別殺菌)	0.96	6.2	1.5
	0.64	6.1	1.5
	0.32	6.0	1.5

基礎培地: グルコース 10.0%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot$
 $4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 酵母エキス 1.0%, CaCO_3 1.0%, pH 7.2.

モニウム, 塩化アンモニウム, 尿素を検討したが, DAP 蓄積には尿素が最もよかった。しかし生育はあまりよくなかった (第 2 表)。

3. 栄養要求物質であるアデニンおよびリジンの添加量の影響

当菌株はアデニンおよびリジンを要求するので, アデニンおよびリジンの濃度は重大な影響を及ぼすものと考え

第 3 表 DAP 蓄積に対する栄養要求物質の濃度の影響

(1) 合成培地の場合

栄養要求物質の 添加量 (r/ml)		pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
アデニン	リジン			
100	400	5.0	2.3	0.26
	200	5.0	1.8	0.24
	100	5.0	1.6	0.28
	50	5.6	1.7	0.71
	25	5.9	2.3	0.64
	0	5.8	2.2	0.56
50	400	5.0	1.6	0.23
	200	5.0	1.6	0.21
	100	5.0	1.5	0.21
	50	5.0	1.5	0.20
	25	5.0	1.3	0.29
	0	5.4	1.7	0.34
25	400	5.0	1.2	0.22
	200	5.0	1.5	0.19
	100	5.0	1.2	0.20
	50	5.0	1.2	0.20
	25	5.0	1.5	0.17
	0	5.4	0.7	0.25
0	400	5.4	0.7	0.20
	200	5.0	0.6	0.20
	100	5.0	0.7	0.19
	50	5.0	0.7	0.20
	25	5.4	0.6	0.19
	0	5.4	0.8	0.19

基礎培地: グルコース 10.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%,
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, CaCO_3 1.0%, pH 7.2.

第 4 表 DAP 蓄積に対する栄養要求物質の濃度の影響

(2) 酵母エキスを含む場合

栄養要求物質の 添加量 (r/ml)		pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
アデニン	リジン			
100	200	6.0	4.0	0.57
	100	5.8	3.0	0.76
	50	6.0	2.7	1.02
	25	6.0	3.1	1.12
	0	6.0	2.5	1.15
	200	6.0	3.1	0.61
50	100	6.0	3.7	0.79
	50	6.0	3.4	0.97
	25	6.0	2.9	1.11
	0	6.0	2.5	1.19
	200	6.0	3.9	0.53
	100	5.9	3.3	0.80
0	50	6.0	3.1	0.80
	25	6.0	3.2	0.96
	0	6.0	2.7	0.87

基礎培地: 第 3 表脚註のものに酵母エキス 1.0% を加えたものを用いた。

えられる。そこで, アデニンおよびリジンの濃度について検討し, 第 3, 4 表のような結果を得た。第 3 表の場合は合成培地の場合であり, 第 4 表はさらに酵母エキスを加えた場合である。

合成培地では一般に, 生育, DAP 蓄積ともに悪い。アデニンに対する生育レスポンスはみられたが, リジンでははっきりしなかった。DAP 蓄積にはリジン濃度が低く, アデニン濃度が高い方が適当であり, リジン 50 r/ml 以下, アデニン 100 r/ml で最もよい値が得られた。

酵母エキス 1.0% を含む場合 (第 4 表) には, 生育, DAP 蓄積ともに向上した。リジンはやはり低濃度でよく 50 r/ml 以下が適当であり, アデニンは酵母エキスがあるためほとんど影響しなかった。

さらに, リン酸およびマグネシウムの最適濃度で酵母エキス, アデニン, リジンの添加量について検討した。すなわち, 上記の実験では KH_2PO_4 および K_2HPO_4 を 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.025% 添加したが, 後述の結果からもっと高濃度の方がよいことがわかったので, 最適と考えられる濃度, すなわち KH_2PO_4 および K_2HPO_4 0.25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% を含む培地で, 酵母エキス, アデニン, リジン濃度を変えた場合について検討した。その結果, 第 5 表に示したように, リン酸およびマグネシウム低濃度の場合に比較して DAP 蓄積量は多く, 酵母エキス, アデニンおよびリジンの影響が少なかった。たとえばリジン高濃度 (200 r/ml) でも DAP 蓄

積量はあまり低くならなかった。

KY 7525 についても、合成培地および酵母エキス培地で検討したがいずれも DAP 蓄積量は低く、1 mg/ml 以下であった。

4. リン酸およびマグネシウムの影響

リン酸源として KH_2PO_4 および K_2HPO_4 を用い、マ

第 5 表 DAP 蓄積に対する栄養要求物質の影響
(3) リン酸およびマグネシウムが最適濃度で酵母エキスを含む場合

酵母エキスの濃度 (%)	栄養要求物質の添加量 (r/ml)		pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
	アデニン	リジン			
2.0	200	200	8.2	2.5	2.03
		100	8.2	2.3	2.36
		50	8.4	2.9	2.44
		25	8.4	2.9	2.62
		12.5	8.2	2.8	2.58
	100	200	8.3	2.4	2.52
		100	8.2	2.4	2.35
		50	8.2	2.6	2.64
		25	8.2	2.8	2.77
		12.5	8.2	2.9	2.72
	50	200	8.2	2.2	2.31
		100	8.2	2.6	2.60
		50	8.0	2.5	2.74
		25	7.7	2.8	2.71
		12.5	7.4	2.9	2.71
1.0	200	200	7.8	2.4	1.99
		100	7.4	2.0	2.16
		50	7.2	2.1	2.33
		25	7.2	2.2	2.29
		12.5	7.1	2.1	2.22
	100	200	7.8	2.2	1.98
		100	7.7	1.8	2.07
		50	7.2	2.0	2.29
		25	7.1	2.1	2.20
		12.5	7.0	2.0	2.11
	50	200	7.8	2.7	1.78
		100	7.9	2.1	2.06
		50	7.4	2.1	2.34
		25	7.0	2.1	1.91
		12.5	7.2	2.1	1.98
0.5	200	200	7.3	1.9	1.72
		100	—	—	—
		50	7.2	1.8	1.64
		25	7.1	1.5	1.42
		12.5	7.0	1.4	1.38
	100	200	7.0	1.7	1.52
		100	7.2	1.7	1.61
		50	7.1	1.5	1.29
		25	7.0	1.5	1.32
		12.5	6.9	1.3	1.19
	50	200	7.4	2.1	1.38
		100	—	—	—
		50	7.1	1.4	1.32
		25	7.0	1.4	1.26
		12.5	6.9	1.4	1.36

基礎培地：グルコース 10.0%， KH_2PO_4 0.25%， K_2HPO_4 0.25%， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%， $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%， CaCO_3 1.0%，尿素 1%，pH 7.2。

グネシウム源として $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を用いて、それらの濃度の影響を検討した。第 6 表に示したように、窒素源として尿素を用いた場合および硫酸アンモニウムを用いた場合について、 KH_2PO_4 と K_2HPO_4 およびマグネシウムの濃度を变化させて DAP 蓄積に対する影響を検討した。窒素源として尿素を用いた場合には、リン酸濃度は DAP 蓄積には 0.25% 以上が良好であり、生育には顕著な影響はみられなかった。マグネシウムは低濃度の方が良好で、高濃度では DAP は少なく、アラニンおよびグルタミン酸が蓄積した。しかし、マグネシウム高濃度でも、リン酸が高濃度になるにつれて DAP 蓄積は回復され、アラニンおよびグルタミン酸は蓄積されなくなった。窒素源として硫酸アンモニウムを用いた場合には、リン酸濃度による大きな影響はみられなかったが、高濃度の方がやや良好であった。マグネシウムによる影響はほとんどなかった。

5. 天然物質の添加

さらに蓄積量を増加させることを目的として天然物質の添加を試みた。天物物質としてペプトン、NZ アミン、

第 6 表 DAP 蓄積に対するリン酸およびマグネシウムの影響 (窒素源として尿素を用いた場合)

$\left\{ \begin{array}{l} \text{KH}_2\text{PO}_4 \\ \text{K}_2\text{HPO}_4 \end{array} \right\}$ (%)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)	pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
0.05	0.025	8.2	2.7	1.74
	0.05	8.2	2.9	1.49
	0.10	8.0	2.8	1.52
	0.25	8.6	0.6	0.90
	0.50	7.8	2.7	0.77
0.10	0.025	8.4	2.4	1.82
	0.05	8.2	2.4	1.88
	0.10	8.0	2.2	1.76
	0.25	8.2	0.7	1.15
	0.50	7.6	1.9	1.12
0.25	0.025	8.0	1.5	2.10
	0.05	7.0	2.2	2.34
	0.10	7.4	1.8	2.42
	0.25	7.6	1.2	2.22
	0.50	7.8	1.3	1.62
0.50	0.025	7.2	2.3	2.42
	0.05	6.8	2.3	2.18
	0.10	6.8	2.0	2.30
	0.25	6.6	2.1	2.25
	0.50	7.4	2.4	2.42
1.00	0.025	6.6	2.2	2.14
	0.05	6.6	2.0	2.25
	0.10	6.6	2.3	2.48
	0.25	6.4	2.0	2.07
	0.50	6.6	2.1	2.06

基礎培地：グルコース 10.0%，尿素 1.0% (別殺菌)， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%， $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%， CaCO_3 1.0%，酵母エキス 1.0%，アデニン 100 γ/ml，リジン 25 γ/ml，pH 7.2。

第7表 DAP 蓄積に対する天然物質の影響

天然物質		pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
種	濃度 (%)			
ペプトン	1.0	8.8	1.7	0.65
	0.5	9.0	0.9	0.82
	0.25	9.0	1.0	1.30
NZ アミン	1.0	9.0	1.8	0.51
	0.5	9.0	0.9	0.65
	0.25	9.0	1.1	1.10
コーン・ステイ ープ・リカー	1.0	9.0	1.0	1.78
	0.5	9.0	0.6	1.73
	0.25	9.0	0.7	1.53
肉エキス	1.0	9.0	1.3	0.68
	0.5	9.0	1.4	1.65
	0.25	9.0	1.3	1.58
それぞれ				
コーン・ステイ ープ・リカー+ カザミノ酸	0.6	9.0	1.2	1.53
	0.2			
	0.3			
	0.1	9.0	1.3	1.60
	0.15			
	0.05	8.8	1.2	1.53
無添加	—	—	1.6	0.79

基礎培地: グルコース 10.0%, KH_2PO_4 0.25%, K_2HPO_4 0.25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, Na-RNA 0.01%, CaCO_3 2.0%, 尿素 1%, pH 7.2.

肉エキス, コーン・ステイープ・リカー, コーン・ステイープ・リカー+カザミノ酸について, 窒素源が硫酸と尿素の場合について検討した。その結果, 第7表に示したように, 肉エキス, コーン・ステイープ・リカー, およびコーン・ステイープ・リカー+カザミノ酸の場合に比較的良好な結果が得られたが, 他の実験と比較して DAP 蓄積は低く, 2 mg/ml 以下であった。

6. 培養液量の検討

最適通気量にするため培養液量を検討した結果, 第8表に示したようにあまり大きな影響はなかったが, 10 ml

第8表 培養液量の DAP 蓄積に及ぼす影響

窒素源	培養液量 (ml)	4日間培養			5日間培養		
		pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)	pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
硫酸アン モニウム 2.0%	10	6.2	2.25	2.59	6.2	3.2	3.28
	20	6.2	2.05	2.20	6.1	2.2	2.65
	30	6.2	1.7	2.38	6.1	2.0	2.65
	40	6.2	1.7	2.10	6.2	1.8	2.48
尿 素 1.0%	10	7.2	2.75	2.42	7.2	3.1	2.69
	20	7.2	1.7	2.38	7.6	2.3	2.25
	30	7.2	1.65	2.11	7.2	1.4	2.18
	40	6.8	2.10	1.75	7.0	2.3	2.60

基礎培地: グルコース 10.0%, KH_2PO_4 0.25%, K_2HPO_4 0.25%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, 酵母エキス 1.0%, アデニン 100 γ /ml, リジン 25 γ /ml, CaCO_3 2.0%, pH 7.2.

第9表 培養温度の検討 (37° で培養した場合)

窒素源	{ KH_2PO_4 K_2HPO_4	{ MgSO_4 $7\text{H}_2\text{O}$	5日間培養		
			pH	菌体乾物量 (mg/ml)	DAP 蓄積量 (mg/ml)
硫酸アン モニウム 2.0%	{ }	{ }	{ }	{ }	{ }
尿 素 1.0%	{ }	{ }	{ }	{ }	{ }

基礎培地: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 以外は第8表に同じ。

で良好な結果が得られた。なお第8表に示した DAP 蓄積量は培養中の培養液量の減少を補正した値である。

7. 培養温度の検討

以上の実験はすべて 30° で培養したが, *B. subtilis* は高温に適しているので, 37° での培養実験を試みた。第9表に示したように, あまりよい結果は得られなかったが, リン酸, マグネシウム高濃度の場合は良好な結果を得た。

考 察

以上の実験において, DAP 蓄積量を 3.3 mg/ml 以上にあげることはできなかった。その原因の1つとして生育が悪いことがあげられ, その点で改良されれば DAP 蓄積量の増加も考えられる。

リン酸高濃度で良好な結果が得られたが, 菌体のリン酸源としてはそれほど多量のリン酸を必要としないと考えられるので, 興味深い問題である。リン酸による細胞膜透過性の変化の問題などが考えられるが, さらに検討を要する。

要 約

(1) *Bacillus subtilis* (Ade⁻, Lys⁻) KY 7525 および KY 7526 が DAP を蓄積することを確認した。蓄積量は KY 7526 の方が多かった。

(2) KY 7526 の培養液上清より DAP を分離, 精製し, meso-DAP (粉末), meso-と LL-DAP の混合物, および LL-DAP (meso-DAP を少量含む結晶) を得た。

(3) KY 7526 について培養条件を検討した結果, 蓄積量は 3.3 mg/ml に達した。炭素源としてはグルコース, フラクトースが良好で, キシロースもややよかった。

窒素源としては尿素が良好であった。アデニンは 100 γ /ml 以上で、リジンは 50 γ /ml 以下が適当であった。リン酸およびマグネシウムは尿素を窒素源として使用した場合はリン酸濃度が高い方がよく、マグネシウム高濃度でグルタミン酸およびアラニンが蓄積し、DAP は少なかった。しかしその場合でもリン酸濃度を高くすれば DAP 蓄積が回復された。窒素源として硫酸アンモニウムを用いた場合は、リン酸およびマグネシウムはあまり影響しなかったが、リン酸高濃度の方が比較的好かった。また合成培地よりも天然培地の方が良好で、天然物質としては酵母エキス、肉エキス、コーン・スティープ・リカーなどが適当であった。培養液量は少ない方がよかった。

- (1) B. D. Davis : *Nature*, **169**, 534 (1952).
- (2) L. D. Wright, E. L. Cresson : *Proceed. Soc. Expt. Biol. Med.*, **82**, 354 (1953).
- (3) L. E. Casida : U. S. 2,771,396 (1956).
- (4) H. T. Huang, F. Meadow : U. S. 2,947,666 (1960).
- (5) H. T. Huang, F. Meadow, J. M. Griffin, H. Hills, J. H. Fried : U. S. 2,955,986 (1960).
- (6) R. C. Nubel : U. S. 2,968,594 (1961).
- (7) 中山 清, 木下祝郎 : 本誌, **35**, 113 (1961).
- (8) C. Gilvarg : *J. Biol. Chem.*, **233**, 1501 (1958).
- (9) L. E. Rhuland, E. Work, R. F. Denman, D. S. Hoare : *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 4844 (1955).