しょうゆ防黴剤に関する研究

(第9報) 各種微生物の生産するパラオキシ安息香酸 ブチル分解酵素について

天野 武雄*・竹内 徳男*・好井 久雄*

Studies on the Shoyu Anticeptics

Part IX On the esterase of butyl *p*-hydroxybenzoate produced by various kinds of microorganisms

TAKEO AMANO, TOKUO TAKEUCHI, and HISAO YOSHII

Esterase produced by microorganisms which catalyze butyl *p*-hydroxybenzoate into *p*-hydroxybenzoic acid. The enzyme was widely found in molds, and the activity was in following order; *Aspergillus* > *Penicillium* > *Fungi imperfecti* > *Mucor* > *Rhizopus*.

The esterase activity could not be observed in strains of yeasts and bacteria tested, except in *Bacillus subtilis*.

The optimum pH of the enzyme produced by *Aspergillus sojae* was about 6.0 and the enzyme was stable at pH between 3.2 and 9.0 at room temperature. The activity remained for 15 minutes at 50°C at pH 6.0, while it was inactivated rapidly at 70°C. The property coincided well with that of *Aspergillus flavus*. These enzymatic properties agreed closely with those of the esterase in shoyu (soy sauce). Therefore, it will be possible to conclude that butyl *p*-hydroxybenzoate in shoyu is mainly hydrolyzed by the esterase produced by *Aspergilli*. (Received November 30, 1967)

パラオキシ安息香酸ブチル (以下 P.O.B.B. と略記)
分解能を有する微生物として *Aspergillus sojae*¹⁾, *Pseudomonas ovalis*²⁾ が報告されている。

著者らは前報³⁾において、しょうゆ保存料 P.O.B.B. がしょうゆ中で短時間に加水分解され、その分解比はしょうゆの種類によってことなり、麴の使用量と相関性があることを認めた。これらの結果からしょうゆ中の P.O.B.B. 分解酵素 (仮称 P.O.B.B.-esterase) は麴に由来することを推定し、同時に P.O.B.B. を分解し当モルのパラオキシ安息香酸 (以下 P.O.B.A. と略記) を生成することを確認した。

本報では、P.O.B.B.-esterase の生産微生物の検索を目的として、いくつかの糸状菌、酵母、細菌を純粋培養し、その P.O.B.B. 分解能を調べた。その結果供試した *Aspergillus* 5 株、*Mucor* 2 株、*Rhizopus* 2 株、*Penicillium* 4 株、*Neurospora*、*Fusarium*、*Myrothecium* 各 1 株の全糸状菌と *Bacillus subtilis* の 1 株に P.O.B.B.

分解能を認めた。

実験方法

1. 各種微生物の培養法

(1) 糸状菌の培養法

麴培養は 200 ml 容三角フラスコに麴 10 g、もみがら 3 g、水 7 g を入れ、10 lb、30 分殺菌、あらかじめ麴汁寒天斜面培地で前培養した各糸状菌の孢子または菌糸を 1 白金耳ずつ接種し 30°C で 3~7 日間培養した。

液体培養は麴エキス (直糖 5%)、KH₂PO₄ 0.5%、ペプトン 5% の培地を 100 ml 容三角フラスコに 30 ml 入れ、10 lb、20 分殺菌 (殺菌後の pH 5.1) し、各糸状菌の 1 白金耳を tween 80 0.05% を含む 0.85% 生理食塩水 2 ml で希釈した各菌液を 1 滴ずつ接種、30°C で 7 日間培養した。培養は同時に 2 点行ない 1 点を菌体重量測定用に、他の 1 点を酵素力価の測定用に供した。

(2) 酵母の培養法

* 愛知県食品工業試験所 (名古屋市区新福寺町 2-13)

Food Research Institute, Aichi Prefecture. Nishi-ku, Nagoya.

麹エキス（直糖 5%）， KH_2PO_4 0.5%，ペプトン 0.2% の培地を 100 ml 容三角フラスコに 50 ml 入れ，10 lb 20 分殺菌（殺菌後の pH 5.70）し，各酵母の 1 白金耳を接種，30°C で 5 日間培養した。

(3) 細菌の培養法

ペプトン 1%，酵母エキス 0.5%，ブドウ糖 1%， K_2HPO_4 0.5%，酢酸ナトリウム 1% の培地を 100 ml 容三角フラスコに 50 ml 入れ，10 lb，20 分殺菌（殺菌後の pH 6.92）し，各細菌を 1 白金耳ずつ接種，30°C で 5 日間培養した。

2. 酵素液の調製

菌体外酵素は，液体培地では培地をそのまま用いた。麹培地では M/60 リン酸緩衝液 50 ml で 30°C，2 時間ときどき振盪しながら抽出し東洋 No. 6 濾紙で濾過し酵素液とした。

菌体内酵素は，菌体を蒸留水で数回洗浄し，その後室温の真空デシケーター中で乾燥した。50 ml 容ガラス容器にこの乾燥菌体と M/60 リン酸緩衝液 5 ml と直径 0.45~0.5 mm のガラス玉約 20 g を入れる。このガラス容器を B. BRAUN のセルホモジナイザーに装着し，炭酸ガスで 0°C 以下に冷却し，4,000 rpm で 1 分間菌体を磨砕した。磨砕後同緩衝液をさらに 25 ml 加えて全

量を 30 ml とし，この懸濁液を遠心分離または濾紙で濾過し酵素液とした。

3. P.O.B.B.-esterase 作用の測定法

(1) 基質 P.O.B.B. 溶液

基質として 0.5 mM の P.O.B.B. 水溶液 (97.1 mg/l) を用いた。

(2) 酵素作用条件

1.5×18 cm 試験管に基質 P.O.B.B. 溶液 5 ml と任意の pH の McIlvaine 緩衝液 4 ml を混合し，5 分間恒温水槽に静置したのち，酵素液 1 ml を加え一定時間作用させる。酵素反応の停止は，21% トリクロル酢酸 2 ml 加えて行なった。P.O.B.B. 分解率の表示は反応液 10 ml 中の P.O.B.B. 分解 μM である。

4. 分析法

(1) P.O.B.A. および P.O.B.B. の定量法

著者らの既報³⁾⁴⁾の方法による。

(2) 菌体量の測定法

糸状菌は菌蓋を蒸留水でよく洗浄し，105°C で 3 時間乾燥して乾燥重量を求めた。酵母，細菌は使用した培地を対照として，培養液の濁度を 660 m μ の吸光度で表わした。

第1表 各種糸状菌の P.O.B.B. 分解能（数培養）

	pH 5		pH 7	
	分解 P.O.B.B.	生成 P.O.B.A. μM /反応液 10 ml	分解 P.O.B.B.	生成 P.O.B.A.
<i>Mucor mucedo</i>	2.22	2.18	0.20	0.19
<i>Mucor plumbeus</i>	0.13	痕跡	0.09	痕跡
<i>Rhizopus japonicus</i>	0.03	0.11	0.05	0.06
<i>Rhizopus nigricans</i>	0.11	痕跡	痕跡	痕跡
<i>Neurospora sitophila</i>	1.04	1.04	2.28	2.18
<i>Fusarium oxysporum</i> *	2.26	2.30	2.50	2.50
<i>Myrothecium verrucaria</i> *	0.35	0.35	0.82	0.88
<i>Aspergillus sojae</i>	2.50	2.52	2.50	2.49
<i>Aspergillus tamarii</i>	2.46	2.53	2.16	2.08
<i>Aspergillus saitoi</i>	2.50	2.44	0.17	0.19
<i>Aspergillus flavus</i>	2.50	2.48	2.50	2.54
<i>Aspergillus niger</i>	2.50	2.44	2.50	2.51
<i>Penicillium chrysogenum</i> *	2.37	2.22	1.19	1.20
<i>Penicillium cyclopium</i> Westling	2.37	2.38	1.17	1.25
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	2.24	2.35	0.61	0.69
<i>Penicillium purpurescens</i> *	2.01	1.85	0.39	0.39

酵素液：数 10 g，もみがら 3 g，水 7 g に各菌を 1 白金耳接種後，4（*7）日間 30°C で培養後，M/60 リン酸緩衝液 50 ml で抽出した液。

酵素作用方法：酵素液 1 ml，基質 P.O.B.B. (0.5 μM /ml) 5 ml，McIlvaine 緩衝液 (pH 5, pH 7) 4 ml を混合し，40°C で 16 時間作用後，21% T.C.A. 2 ml を加え反応を停止。

第2表 各種糸状菌の P.O.B.B. 分解能 (液体培養)

	菌体内酵素 分解 P.O.B.B. μM /反応液 10 ml		乾燥菌体 重量 g	菌体外酵素 分解 P.O.B.B. μM /反応液 10 ml		最終 pH
	pH 5	pH 7		pH 5	pH 7	
<i>Mucor mucedo</i>	痕跡	痕跡	0.504	0.39	痕跡	4.35
<i>Mucor plumbeus</i>	"	0.24	0.197	痕跡	"	5.05
<i>Rhizopus japonicus</i>	"	痕跡	0.251	"	"	7.55
<i>Rhizopus nigricans</i>	"	0.18	0.188	"	"	4.85
<i>Neurospora sitophila</i>	"	0.22	0.129	"	"	5.15
<i>Fusarium oxysporum</i> *			痕跡	"	"	4.93
<i>Myrothecium verrucaria</i> *			"	"	"	4.95
<i>Aspergillus sojae</i>	0.48	0.52	0.623	0.44	0.44	7.70
<i>Aspergillus tamarii</i>	0.16	痕跡	0.429	0.13	0.13	8.28
<i>Aspergillus saitoi</i>	痕跡	"	0.380	0.26	痕跡	5.30
<i>Aspergillus flavus</i>	0.37	0.39	0.330	0.46	0.37	8.35
<i>Aspergillus niger</i>	0.27	痕跡	0.535	0.35	0.29	5.90
<i>Penicillium chrysogenum</i> *	痕跡	"	0.569	痕跡	痕跡	7.88
<i>Penicillium cyclopium</i> Westling	0.29	0.20	0.657	"	"	7.83
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp			痕跡	"	"	4.98
<i>Penicillium purpurescens</i> *			"	"	"	4.80

培養法: 麹エキス (直糖 5%), KH_2PO_4 0.5%, ペプトン 5%, pH 5.1 の培地 30 ml に各菌を接種し 30°C で7日間培養。

菌体内酵素: 菌体を水洗後, 真空デシケーター中で乾燥し菌体に M/60 リン酸緩衝液 5 ml 加えガラス玉で磨砕後, さらに緩衝液 25 ml を加え研過したもの。

菌体外酵素: 培地をそのまま用いる。

酵素作用方法: 第1表と同じ。

実験結果

1. 各種糸状菌の P.O.B.B. 分解能

第1, 2表に示すようにすべての糸状菌に P.O.B.B. 分解能を認めた。P.O.B.B. 分解能は, 大略 *Aspergillus* > *Penicillium* > *Fungi imperfecti* > *Mucor* > *Rhizopus* の順に強力であった。*Mucor*, *Penicillium* は pH 5 区の方が pH 7 区より P.O.B.B. 分解能が強力であったが, *Fungi imperfecti* の場合はこれと全く逆であ

った。

麹培養の場合は P.O.B.B. 分解能は比較的強力であったが, 液体培養の場合は培地成分, 濃度などを種々変えて検討したが, いずれも微弱な P.O.B.B. 分解能しか示さなかった。また, 糸状菌では, P.O.B.B. を水解して当モルの P.O.B.A. を生成した。

2. 酵母, 細菌の P.O.B.B. 分解能

第3, 4表に示すように酵母, 細菌は, 菌体内, 菌体外のいずれにも P.O.B.B. 分解能をほとんど認めな

第3表 各種酵母の P.O.B.B. 分解能

	分解 P.O.B.B. μM /反応液 10 ml 菌体内酵素		菌体外酵素		最終 pH	菌体量 -log T (660m μ)
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7		
<i>Saccharomyces rouxii</i>	0	0	0	0	4.13	1.45
<i>Hansenula anomala</i>	0	0	0	0	3.80	1.70
<i>Pichia membranaefaciens</i>	0	0	0	0	4.22	0.840
<i>Separated film yeast</i> *	0	0	0	0	3.75	1.05

培養法: 麹エキス (直糖 5%), KH_2PO_4 0.5%, ペプトン 0.2%, pH 5.70 の培地 50 ml に各菌を接種し, 30°C で5日間培養。

酵素作用方法: 第1表と同じ。

菌体内酵素, 菌体外酵素: 第2表と同じ操作によって調製したもの。

* しょうゆ酸味より分離, 未同定株

第4表 各種細菌のP.O.B.B. 分解能

	分解 P.O.B.B. μM / 反応液 10 ml				最終 pH	菌 体 量 -log T (660m μ)
	菌体内酵素		菌体外酵素			
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7		
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0.14	0.26	8.20	卅
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	0	0	5.30	0.675
<i>Streptococcus faecalis</i>	0	0	0	0	4.50	0.750
<i>Pediococcus halophilus</i>	0	0	0	0	5.30	0.710
<i>Micrococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	5.05	1.20

培養法：酵母エキス 0.5%，ブドウ糖 1%， KH_2PO_4 0.5%，ペプトン 1%，酢酸ナトリウム 1%，pH 6.92 の培地 50 ml に各菌を接種し、30°C で 5 日間培養。

酵素作用方法：第 1 表と同じ。

菌体内酵素，菌体外酵素：第 2 表と同じ操作によって調製したもの。

第1図 P.O.B.B.-esterase の至適 pH

酵素作用方法：第 1 表と同じ，ただし反応時間は *Asp. flavus* 1 時間，*Asp. sojae* 4 時間，緩衝液は McIlvaine 緩衝液
酵素液：籾 10 g，もみ 3 g，水 7 g の培地に 30°C，3 日間培養したものに水 50 ml を加え抽出した液。

—●— *Asp. sojae*：第 2, 3, 4 図共通。
—○— *Asp. flavus*：第 2, 3, 4 図共通。

った。しかし，*Bacillus subtilis* の培地にごく微弱な P.O.B.B. 分解能を認めた。

3. *Aspergillus sojae* と *Aspergillus flavus* の麹培養抽出液の酵素的諸性質の比較

第 1~4 表の結果で，P.O.B.B.-esterase は糸状菌ことに *Aspergilli* によって多量生産されることが理解できる。

また前報の結果⁸⁾からも，麴の添加比率の高いものほど P.O.B.B.-esterase 活性が高いことから，P.O.B.B.-esterase は，しょうゆ麴の製造に使われている *Aspergillus sojae*，しょうゆ麴に関連のある *Aspergillus flavus*（推定株）によって生産された酵素がしょうゆ中に移行してくるものと推定されるが，この点をさらに確認するために両糸状菌の酵素的諸性質を比較した。

第2図 P.O.B.B.-esterase の至適温度

酵素作用方法：第 1 表と同じ，ただし反応時間は 1 時間，作用 pH は pH 6.0 McIlvaine 緩衝液。
酵素液：第 1 図と同じ。

(1) P.O.B.B.-esterase の至適 pH

各 pH の McIlvaine 緩衝液を用い至適 pH を求めた結果を第 1 図に示す。*Aspergillus sojae*，*Aspergillus flavus* とも至適 pH は pH 6.0 附近にあり，しょうゆ中に含まれる P.O.B.B.-esterase の至適 pH 7.0 附近⁸⁾と近似していた。

(2) P.O.B.B.-esterase の至適温度

第 2 図に示すごとく，*Aspergillus flavus* の P.O.B.B.-esterase の至適温度は 50°C 附近にあり，*Aspergillus sojae* のそれは反応温度 30~50°C で，ほぼ同一の分解率を示した。⁹⁾また，両酵素とも 60°C では，P.O.B.B. の分解は減少し酵素の失活が起るものと思われる。

これらの結果は，しょうゆ中の P.O.B.B.-esterase が反応温度 30~50°C では，ほぼ同一の分解率を示し，60°C では P.O.B.B.-esterase の失活が起る結果⁸⁾とよく一致する。

第3図 P.O.B.B.-esterase の耐熱性

酵素作用方法: pH 6.0 McIlvaine 緩衝液 4 ml と酵素液 1 ml を混合後各温度に 15 分間保持, その後急冷し, 基質 5 ml を加え 40°C で 1 時間作用させる。
酵素液: 第 1 図と同じ。

第4図 P.O.B.B.-esterase の pH 安定性

酵素作用方法: 酵素液* 1 ml と緩衝液 (pH 1.2~2.1 Clark-Lubs, pH 2.6~7.9 McIlvaine 緩衝液, pH 9.0~10.5 M/20 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + \text{M}/10 \text{ NaOH}$ 緩衝液) 4 ml を混合後, 10°C で 24 時間放置し, その後 pH 6.0 McIlvaine 緩衝液で 4 倍に希釈する。その 1 ml を酵素液とし後の操作は第 1 表と同じ。
* 酵素液: 第 1 図と同じ。

(3) P.O.B.B.-esterase の耐熱性

pH 6.0 McIlvaine 緩衝液 4 ml と酵素液 1 ml を混合し, 各温度の恒温槽に 15 分間保持後氷水中で急冷し, その後基質 5 ml を加え 40°C で 1 時間作用させた結果を第 3 図に示す。図から分かるように両菌の生産する P.O.B.B.-esterase とも 50°C~60°C から失活が起り, 70°C, 15 分間の条件で完全に失活した。これはしょうゆ中の P.O.B.B.-esterase が, 70°C 以上の加温で完全に失活する結果⁵⁾と一致する。

(4) P.O.B.B.-esterase の pH 安定性

酵素液 1 ml と緩衝液 (Clark-lubs, McIlvaine, M/20 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + \text{M}/10 \text{ NaOH}$ 緩衝液) 4 ml を混合 (混合後の pH は, pH メーターで測定し反応液の pH とした), 10°C で 24 時間放置後 pH 6.0 McIlvaine 緩衝液で 4 倍に希釈し, その 1 ml を酵素液とし, さらに pH 6.0 McIlvaine 緩衝液 4 ml, 基質 P.O.B.B. 液 5 ml を加え, 40°C で 16 時間作用させた。その結果を第 4 図に示す。図から分かるように両菌の生産する P.O.B.B.-esterase とも pH 3.2~9 間では安定であったが, それ以外の pH では急激に失活した。

以上の結果から *Aspergillus flavus* と *Aspergillus sojae* の P.O.B.B.-esterase は, 至適温度を除き至適 pH, 失活温度, pH 安定性などの点で類似した性質を示し, また, しょうゆ中に含まれる P.O.B.B.-esterase とも多少の差はあるが, 上記の諸特性はほとんど一致していた。

考 察

生しょうゆ中に含まれる P.O.B.B.-esterase の生産微生物の検索を行なった結果, 前報⁹⁾で推定したごとく麹菌に由来することを確認した。すなわち, しょうゆ熟成時の主要菌である *Saccharomyces rouxii*, *Pediococcus halophilus* からの P.O.B.B.-esterase の生産は認められず, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus flavus* などの麹菌に顕著な P.O.B.B.-esterase 活性が認められた。同時に, これら麹菌からの P.O.B.B.-esterase の諸性質はしょうゆ中の P.O.B.B.-esterase の性質と一致することを確認した。

また糸状菌の生産する P.O.B.B.-esterase は, しょうゆ中の P.O.B.B.-esterase と同様に, ともに P.O.B.B. を加水分解して当モルの P.O.B.A. を生成し, しょうゆと同様それ以上の分解はないものと思われる。

すなわち, P.O.B.A. の添加培地で培養した *Pseudomonas putida*⁹⁾, *Pseudomonas desmolytica*⁷⁾ の酵素からは P.O.B.A. からプロトカテキュー酸を生成することが報告されている。また照井ら⁸⁾は *Aspergillus niger* において適応的に安息香酸 → P.O.B.A. → プロトカテキュー酸 → 核開裂という酵素系を確めている。しかし, 著者らは実験方法に示したごとく, とくに P.O.B.A. に対する適応化の操作は採用せず, たんに培地に各菌を殖増させた生産酵素について実験しているため, P.O.B.A. がさらに分解するという現象は認めなかった。また, この結果はしょうゆ中の安息香酸量が熟成全期を通じて変化しな

いという花岡ら⁹⁾の報告からも、P.O.B.A. に適応させない菌体では P.O.B.A. の分解酵素は生成されないことが推察できる。

次に著者らが P.O.B.B.-esterase と仮称した本酵素の性格であるが、従来リパーゼは脂肪を脂肪酸とグリセリンに加水分解し、エステラーゼは低級のエステルを有機酸とアルコールに加水分解すると定義されているが、これらの分類は判然たるものでなくリパーゼのあるものは簡単なエステルにも作用するし、逆にエステラーゼのあるものは脂肪にも作用する¹⁰⁾。すなわち、エステラーゼとリパーゼの差異はどの基質に作用しやすいかということになる。

たとえば、*Aspergillus niger* の結晶リパーゼ¹¹⁾¹²⁾ や *Rhizopus delemar*¹¹⁾ のリパーゼは、もちろん脂肪を強力に加水分解するけれども低級なエステルにも作用する。これらのことから、しょうゆ中の P.O.B.B.-esterase が糸状菌の生産するリパーゼによるのか、P.O.B.B. のみを特異的に加水分解する特殊の酵素であるかを検討することは興味ある問題と思われるが今後の研究にまたなければならない。

同様に、本酵素がしょうゆ醸造中 P.O.B.B. 以外の基質にも作用するの否かなどを酵素学的に検討することも必要と思われる。

要 約

しょうゆ醸造に関連のある微生物を中心に、これらの菌のパラオキシ安息香酸ブチル (P.O.B.B.) を分解する酵素 (仮称 P.O.B.B.-esterase) の生成の有無、酵素の特性について検討した。

1. 糸状菌 16 株、酵母 4 株、細菌 5 株の P.O.B.B. 分解能を調べた結果、*Aspergillus* 5 株、*Penicillium* 4 株、*Mucor* 2 株、*Rhizopus* 2 株、*Neurospora*、*Fusarium*、*Myrothecium* 各 1 株の全糸状菌に P.O.B.B.-esterase の存在を認めた。これら糸状菌の生産する P.O.B.B.-esterase は、P.O.B.B. を水解して当モルの P.O.B.A. を生成した。

しかし、酵母には本酵素は認められず、細菌では、*Bacillus subtilis* の 1 株にごく微弱な P.O.B.B. 分解能

が認められたが、他の細菌には全く認められなかった。

2. 糸状菌の菌培養抽出物について P.O.B.B. 分解能を調べた結果、大略 *Aspergillus* > *Penicillium* > *Fungi imperfecti* > *Mucor* > *Rhizopus* の順に強力であった。

3. 糸状菌を菌培養した場合には P.O.B.B.-esterase 活性は強力であったが、液体培養をした際には菌体内、菌体外とも P.O.B.B.-esterase 活性は微弱であった。

4. *Aspergillus flavus* と *Aspergillus sojae* の生産する P.O.B.B.-esterase の諸性質を比較した結果、両菌の酵素とも至適 pH は 6.0 附近、耐熱性は 50°C まで安定で 50°~60°C から失活し始め、70°C、15 分間の加熱で完全に失活する。pH 安定性は pH 3.2~9 まで安定で、それ以外の pH では急激に失活するなど両酵素ともきわめて類似した性質を示した。

これらの諸性質は、しょうゆ中に含まれる P.O.B.B.-esterase の性質ともよく一致した。

終りに終始御指導御鞭撻をいただいた河村所長に深謝する。本研究の一部は 1966 年 10 月、日本発酵工学会大会で講演した。

文 献

- 1) 花岡嘉夫：醱酵工学，40，610 (1962)。
- 2) 古市達也：調味科学，9，(4)，5 (1961)。
- 3) 天野武雄・竹内徳男・好井久雄：調味科学，14，(3)，1 (1967)。
- 4) 天野武雄・竹内徳男・好井久雄：調味科学，14，(1)，5 (1967)。
- 5) 古市達也：調味科学，9，(4)，1 (1961)。
- 6) HOSOKAWA, K. and STANIER, R.Y.: *J. Biol. Chem.*, 241, (10), 2453 (1966)。
- 7) YANO, K., MORIMOTO, M. and ARIMA, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 30, 91 (1966)。
- 8) TERUI, G. and ENATSU, T.: *Tech. Rept. Osaka Univ.*, 6, 203 (1956)。
- 9) 花岡嘉夫・横塚 保：醱酵工学，45, 826 (1967)。
- 10) 赤堀四郎編：酵素研究法 2, (朝倉書店), p. 1 (1956)。
- 11) 福本寿一郎・岩井美枝子・辻阪好夫：科学と工業，38, 373 (1964)。
- 12) IWAI, M., TSUJISAKA, Y. and FUKUMOTO, J.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 10, 13 (1964)。

(1967 年 11 月 30 日受理)