

[生物工学会誌 第72巻 第1号 13-19. 1994]

ノート

特異な不完全菌 *Fusidium* sp. BX-1 の生成するキシラナーゼ大野 信子¹・藤原 佳奈¹・篠山 浩文²・藤井 貴明^{2*}和洋女子大学文家政学部生活学科,¹ 千葉大学園芸学部生物生産科学科²¹〒272 市川市国府台2-3-1²〒271 松戸市松戸648

(平成5年9月30日受付 平成5年11月17日受理)

Xylanase produced by a peculiar, imperfect fungus, *Fusidium* sp. BX-1. —Note— NOBUKO OHNO,¹ KANA FUJIWARA,¹ HIROFUMI SHINOYAMA,² and TAKAAKI FUJII^{2*} (*Department of Food and Nutrition Administrator Training, Faculty of Literature and Home Science, Woyo Women's University, Konodai, Ichikawa-shi, Chiba 272¹; Department of Bioproduction Science, Faculty of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo-shi 271²*) *Seibutsu-kogaku* 72: 13-19, 1994.

The degradation of xylan by an imperfect fungus, *Fusidium* sp. BX-1, was remarkably enhanced in a medium containing glycerol. Under these conditions, the amount of xylan-degrading enzymes produced extracellularly by strain BX-1 was about 15 times larger than that of the medium containing only xylan as a carbon source. A xylanase from these enzymes was purified and proved to be electrophoretically homogeneous. Its molecular mass was estimated to be about 36,000. The optimum pH for its activity was 5.5. The optimum temperature was 60°C. The enzyme was stable within the range of 0-50°C and at pH 4.0-9.0. The enzyme could degrade xylotriose to xylose and xylobiose, but it was inert to xylobiose and phenyl-β-xyloside.

微生物によるキシランの分解に関してはこれまでに多数の報告があり,¹⁻³⁾ キシラナーゼの生産性に触れている最近の報告に限って見てもかなりの数あげられる。⁴⁻¹⁸⁾ しかしながら、酵母ならびに酵母様に生育する微生物によるキシラナーゼに関する報告は比較的少ない。^{2,8,13,19)} 一般にキシラナーゼの生産はキシランによって誘導され、グルコースやキシロースによって抑制される場合が多いが、キシロースの存在下でも酵素を生産するもの^{4,8,11,12,16)} やアミノ酸によって酵素の生産量が増加する例²⁰⁾ も存在し、生産量を制御する因子は単純ではない。

土壌より分離した不完全菌 *Fusidium* sp. BX-1 は広範囲の炭素源を利用して良好に生育し、グリセロールを炭素源にして培養した場合、細胞の形態は酵母状にな

り、アミラーゼを中心にキシラナーゼなどの複数の酵素を細胞外に分泌する。²¹⁾ BX-1 株のアミラーゼに関しては、すでにいくつかの事実が明らかになっており酵素も単一なまでに精製されている。²²⁾ 特に、アミラーゼはデンプンやマルトース等の酵素生産の誘導炭素源をそれぞれ単独に用いて培養した場合より、グリセロール単独あるいはこれらの少量をグリセロールと併用して用いることにより、その生産量がいちじるしく増加することが明らかにされている。²¹⁾ そこで、本報ではキシランへの *Fusidium* sp. BX-1 の作用について調べるとともに生産されるキシラナーゼの精製ならびにその酵素化学的性質について若干の検討を加えた。

菌株は、土壌より分離し、保存してあった不完全菌 *Fusidium* sp. BX-1 を用いた。供試菌株は、前報²¹⁾ に従って1%プルラン(林原生物化学)を炭素源、0.5%酵母エキス(オリエンタル酵母)を窒素源として含む

* 連絡先, Corresponding author.

培地を用いて作成した寒天斜面培地で 30°C にて 5-7 日間培養したのち、4°C で保存した。なお、継代は約 1 ヶ月ごとに行った。本菌株の培養は、基本的には前報²¹⁾に従い 2 % キシラン (Sigma) と 2 % グリセロールを炭素源として含む保存培地と同じ組成の培地の 30 ml, 200 ml をそれぞれ 100 ml, 1 l 容の三角フラスコにいれ、これに供試菌株を接種し、30°C にて 3-5 日間回転振盪 (180 rpm) して行った。酵素の生産のためには、上記培地を含む 1 l 容三角フラスコで 5 日間培養した。

キシラナーゼの活性は、前報²¹⁾に準じて、最終濃度が 0.5 % キシランを基質とし、25 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) からなる組成の反応液 4 ml を含む L-字試験管中で 30°C にて測定した。酵素活性の 1 単位 (U) は、1 分間に生成する還元糖量を 3,6-ジニトロフタル酸法²³⁾にてキシロース相当量 (μmol) として求めて表示した。比活性は、 $\mu\text{mol xylose released/min/mg protein}$ で表した。 β -キシロシダーゼの活性は、最終濃度 10 mM フェニル- β -キシロシドを基質として、100 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) からなる組成の反応液 1.0 ml 中で 30°C にて測定した。上記の条件で 15 分間インキュベートした反応液に 0.55 M の Na_2CO_3 を 5.0 ml, フェノール試薬を 1.0 ml 加えて約 30 分間放置し、660 nm における吸光度を測定して求めた。²⁴⁾ アミラーゼの活性は、前報²¹⁾に準じて最終濃度が 0.5 % 可溶性デンプンを基質とし、25 mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) を含む反応液中で 30°C にて測定した。酵素活性の 1 単位 (U) は、1 分間に生成する還元糖量を 3,6-ジニトロフタル酸法²³⁾にてグルコース相当量 (μmol) として求めて表した。比活性は、 $\mu\text{mol glucose released/min/mg protein}$ で表示した。なお、培養ろ液中の酵素活性については上記の方法で測定して求めた総活性量をもって、それぞれキシラナーゼおよびアミラーゼの活性として表示した。

タンパク質は、牛血清アルブミンを標準として用い、Lowry らの方法²⁵⁾に従って定量した。

キシラナーゼは、供試菌株を上記のキシラン-グリセロール培地を用い 5 日間培養して得られた培養ろ液より次のような操作によって精製した。

(1) 粗酵素標品の調製：培養ろ液はフラッシュ・エバポレーター (東京理化 MF-5) を用いて 30°C にて約 1/10 量に濃縮したのち、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に対して一夜透析した。その透析内液

を遠心処理して不溶性物質を取り除き、さらに凍結遠心乾燥機 (ヤマト科学 RC-11) を用いて濃縮し、粗酵素標品を得た。

(2) DEAE-cellulose 処理：粗酵素標品を上記酢酸ナトリウム緩衝液にて平衡化された DEAE-cellulose DE52 (Whatman) を加えて緩やかに攪拌したのちろ別した。樹脂を少量の同様の緩衝液で洗浄して得られた洗液と先のろ液とを合わせ、DEAE-cellulose 処理液とした。

(3) CM-cellulose カラム：あらかじめ同上緩衝液で平衡化された CM-cellulose CM32 (Whatman) カラム ($\phi 1.4 \times 30$ cm) に DEAE-cellulose 処理液を付した。これを、塩化ナトリウムの 0-500 mM 直線濃度勾配の同緩衝液 500 ml を用いて溶出した。溶出は流速 25 ml/h で行い、各フラクションは 5.0 ml/tube ずつ集めた。キシラナーゼ活性を持つ画分を合わせて回収し、これを凍結遠心乾燥機を用いて濃縮したのち、10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で一夜透析した。

(4) Sephadex G-150 カラム：透析液を、上記緩衝液で平衡化してある Sephadex G-150 (Pharmacia) カラム ($\phi 1.6 \times 90$ cm) に付し、同緩衝液を用いて流速 8.0 ml/h で溶出した。各フラクションは 2.0 ml/tube ずつ集めた。得られたキシラナーゼ活性画分を集め、凍結遠心乾燥機を用いて濃縮し、これを精製酵素として -20°C で保存した。

未変性の酵素の電気泳動は、Davis の方法²⁶⁾に準じて 7.5 % ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。変性酵素の電気泳動は、試料を 1 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と 1 % 2-メルカプトエタノールで 60°C にて 5 分間処理したのち、Weber と Osborn の方法²⁷⁾に準じて 12 % ポリアクリルアミドゲルを用い 0.2 % SDS を含む緩衝液中で行った (SDS-PAGE)。

タンパク質は、0.25 % Coomassie brilliant blue R-250 を用いて染色した。

分子量は、上記の SDS-PAGE を行って求めた。分子量マーカーは LMW Kit E (Pharmacia) を用いた。また、分子量は別に高速液体クロマトグラフィー (HPLC, 島津液相ポンプ LC-9A, ディテクター SPD-6AV) とカラム (東ソー TSK G2000SW) を用いて求めた。分子量マーカーは Mann Research Laboratories の cytochrome c (12,000), myoglobin (17,800), chymotrypsinogen (25,000), ovalbumin (45,000), albumin (67,000) を用いた。

酵素反応生成物は、ペーパークロマトグラフィーを行い同定した。ペーパークロマトグラフィーは東洋ろ紙 No. 50 を用い、*n*-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3, v/v/v) の展開溶媒中で上昇法によって行った。糖の発色にはアニリン水素フタル酸塩を使用した。

フェニル- β -キシロシドは半井化学薬品より購入した。キシロビオースおよびキシロトリオースは、日下部らの方法^{28,29)}により調製したものをを用いた。

2%キシランを炭素源とした培地とこれにさらに2%グリセロールを添加した培地中での BX-1 株の生育とキシランの溶解の状態を観察した (Fig. 1)。キシラン-グリセロール培地においては、培養4日でキシラン粒子は大部分が消失し、これと比例して BX-1 株の酵母状の細胞がいちじるしく増加してきた。一方、キシラン単独の培地では、酵母状の細胞は増加はしてきただものの、培養5日後においてもかなりのキシランの粒子が残存した。このように BX-1 株によるキシランの分解は、グリセロールの存在下で大きいことが示さ

れた。

本菌の生育は、グリセロールの他にオリーブオイル、オレイン酸上の生育がきわめて良好である。²¹⁾特にオレイン酸については本菌の利用できる炭素源の中では最大の生育を示すことが知られている。オレイン酸とグリセロールは細胞膜の構成成分等生体内では相互に密接な関連にある。そこで、上記の結果に基づきキシランやグリセロール、オレイン酸等が BX-1 株によるキシラナーゼの生産に及ぼす影響についてアミラーゼと比較して調べた (Table 1)。アミラーゼについては、グリセロール培地で多量の酵素が生産され、また、すでに報告されているようにこのグリセロール培地にデンプンの少量 (0.5%) の添加は培養液中の酵素の生産量を約2倍に増加させたが、さらに添加量を増加した場合 (2%) には酵素の生産量をデンプン単独の培地のレベルにまで下げてしまうことが知られている。²¹⁾これに対して、キシラナーゼは、グリセロール単独培地では、キシラン単独培地の酵素生産量よりも

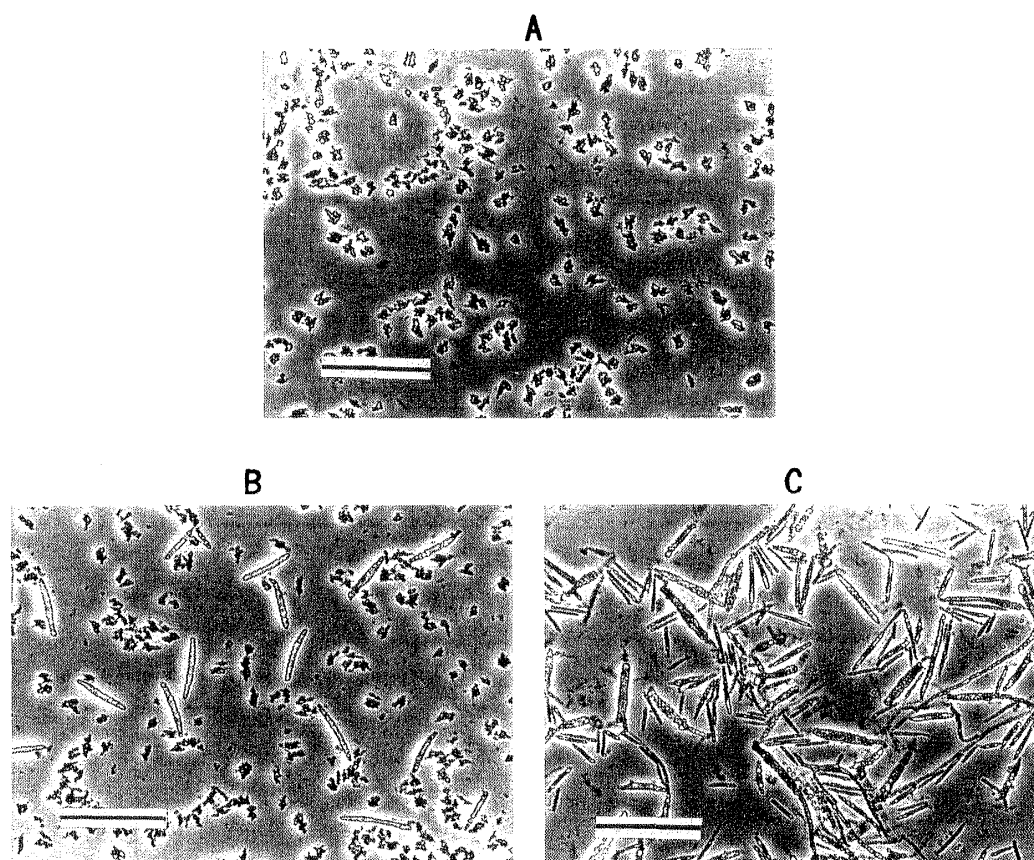


Fig. 1. Degradation of xylan by *Fusidium* sp. BX-1. A: 2% xylan medium (not inoculated). B: The organism was incubated in 2% xylan medium without glycerol for 5 d. C: The organism was incubated in 2% xylan medium with 2% glycerol for 4 d. Bars indicate a length of 20 μ m.

Table 1. Effects of glycerol and oleic acid on production of amylase and xylanase by *Fusidium* sp. BX-1.

Carbon source (%)	Growth (OD 610 nm)	Enzyme activity (U/ml)	
		Amylase	Xylanase
Xylan (2.0)	12.3	0.03	0.620
Glycerol (2.0)	25.1	7.67	0.902
Glycerol (2.0)+Xylan (0.5)	30.6	7.79	10.1
Glycerol (2.0)+Oleic acid (0.5)	45.1	0.09	0.354
Glycerol (2.0)+Xylan (0.5)+Oleic acid (0.5)	48.0	0.08	10.6

The organism was incubated for 4 d.

多いものの、アミラーゼの生産と比較してあまり生産されず、前記の Fig. 1 の結果とも関連するように、キシラン (0.5%) と共存させた場合に初めて多量の酵素 (グリセロール単独の約15倍) が生産されてきた。このとき、アミラーゼの生産量にはほとんど変化が見られなかった。また、このようなグリセロール培地ならびにグリセロール—キシラン培地へのオレイン酸の添加はアミラーゼの生産をいちじるしく低下させたが、キシラナーゼの生産性にはほとんど影響を与えなかった。なお、グリセロール培地へのキシランの添加量はその濃度が4%に増加させた場合に、0.5%の場合のおおよそ2倍ほどに酵素の生産量を増加させた。これとは別に、本菌の培養液中には、キシランのかわりにCM-セルロース (和光純薬)、微結晶セルロース (和光純薬) を基質として遊離還元糖を与える活性は見いだされなかった。このようなグリセロール培地でのアミラーゼとキシラナーゼの生産様式には違いがみられたが、それは炭素源であるデンプンが水に溶解し、アミラーゼがその酵素分解最終産物のグルコースによって酵素の生成が抑制されるのに対して、²¹⁾ キシランは水に不溶で、本菌にとってもかならずしもその分解は容易でなく、また、キシラナーゼが分解産物のキシロースによってその生成を抑制されず、キシロオリゴ糖によって誘導されること (未発表) によるものと考えている。本菌によるキシランの分解は、グリセロールの利用によって生成された酵素によって始まり、この場合、キシランの濃度が高い方が、はじめに生成された酵素の作用を受けやすい状態になり、誘導基質のオリゴ糖もより多く蓄積して、これら一連の生理的な反応が酵素の生産に効果的に働くものと思う。また、オレイン酸が BX-1 株のグリセロール培地でのアミラーゼの生産にはいちじるしく抑制の方向に作用するのに対して、キシラナーゼの生産にはほとんど影響しなかつ

た点も興味のもたれるところであるが、その理由は、現在までのところ明らかとされていない。

BX-1 株が上記のようにキシラン—グリセロール培地において生産したキシラナーゼは、培養ろ液に80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加してみても回収される活性画分は10%に満たなかった。そこで、培養ろ液1 l をフラッシュ・エバポレーターで濃縮したのち、濃縮液を DEAE-セルロースで処理した。濃縮液中のキシラナーゼ活性の約15%は DEAE-セルロースに吸着されたが、本実験では未吸着の活性画分を CM-セルロースを用いたイオン交換クロマトグラフィー、さらに、Sephadex G-150 を用いたゲルろ過を行い、比活性 235 U/mg protein の 3.57 mg のクロマトグラフィー的に単一の精製酵素標品を得た。なお、上記のフラッシュエバポレーター濃縮液中には、キシラナーゼの活性に対して1/10程度の β -キシロシダーゼの活性が検出された。本活性も DEAE-セルロースに吸着される多量の画分と少量の未吸着の画分に分かれた。得られた最終キシラナーゼ精製標品は、ポリアクリルアミドゲル、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) において単一のタンパク染色バンドを示した (Fig. 2)。精製の各段階は Table 2 に要約した。

精製酵素の酵素化学的性質については以下のような若干の検討を行った。本酵素の活性の最適 pH は5.5であった。その活性は pH 4-9 と比較的広い範囲で安定であった。活性の最適温度は60°Cであった。その活性は、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で30分間の加熱に対してほとんど低下することはないが、55°C 以上の温度で急激に低下し始め、70°C においてほぼ完全に失われた。SDS-PAGE を用いて推定した本酵素の分子量は約36,000と概算された (Fig. 2)。この SDS-PAGE の結果と別に行った HPLC のゲルろ過

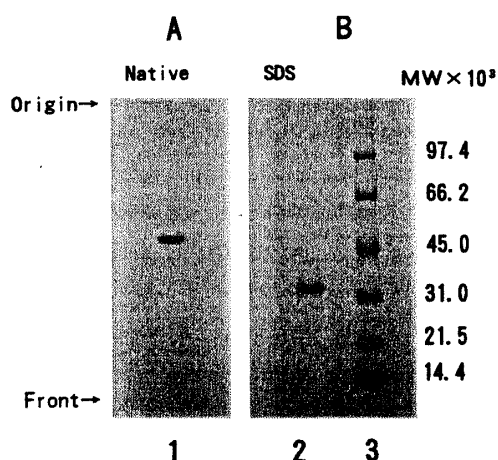


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of xylanase. A: Electrophoresis of native xylanase (Lane 1) on polyacrylamide gel (7.5%). B: Electrophoresis of denatured xylanase and molecular markers on SDS polyacrylamide gel (12%). Lane 2, xylanase. Lane 3, M_r standards: rabbit muscle phosphorylase (97,400), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), bovine carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), and hen egg white lysozyme (14,400).

の結果もほぼ一致した（データ省略）。これより、本酵素は、分子量約36,000のモノマーからなると推定された。金属塩を中心に各種の化合物の本酵素の活性に及ぼす影響を調べた（Table 3）。本酵素は多くの遷移元素によって活性が阻害され、アルカリ土類金属イオンによって活性が若干賦活化される傾向を示した。水銀イオンは阻害的であったがそれほど強くはなかった。本酵素はSDSによって完全に活性を失った。精製酵素標品について、キシランを基質として反応させ、反応生成物をペーパークロマトグラフィーで調べた（Fig. 3A）。本酵素の反応液中にはキシロトリオース、キシロビオース、キシロースに相当するスポットが検出された。これとは別に、本酵素をキシロトリオース

Table 3. Effects of various reagents on activity of xylanase from *Fusidium* sp. BX-1.

Compound (1 mM)	Relative enzyme activity (%)
None	100
FeSO ₄	101
FeCl ₃	93
CoCl ₂	62
NiCl ₂	79
MnCl ₂	82
ZnCl ₂	77
CuSO ₄	68
AgNO ₃	73
HgCl ₂	63
MgCl ₂	100
CaCl ₂	113
SrCl ₂	93
BaCl ₂	108
p-Chloromercuribenzoate	84
N-Ethylmaleimide	94
Idoacetamide	89
Dithiothreitol	100
Sodium dodecyl sulfate	0
Triton X100 (0.05%)	102
Tween 80 (0.05%)	95
EDTA	83

After the enzyme was preincubated at 30°C for 15 min with 1 mM of each compound, the assay was carried out in a mixture containing about 2.0 U of xylanase and these compounds.

と反応させると、これをキシロースとキシロビオースに分解し、一方、キシロビオースに対しては作用しなかった（Fig. 3B）。また、これとは別に本酵素はフェニル-β-キシロシドを基質にβ-キシロシダーゼ活性を測定したが、検出できなかった。以上より、BX-1株により生産されたキシラン分解に関する酵素のうち、今

Table 2. Summary of purification of xylanase produced by *Fusidium* sp. BX-1 in glycerol-xylan medium.

Purification procedure	Total volume (ml)	Protein (mg)	Total enzyme activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	920	552	8,830	16.0	100	1.00
Concentration by evaporator	160	102	9,360	91.8	106	5.74
DEAE-cellulose (batchwise)	54.0	12.0	2,680	219	30.0	13.7
CM-cellulose CM52	10.0	4.00	905	226	10.2	14.1
Sephadex G-150	21.0	3.57	840	235	9.51	14.7

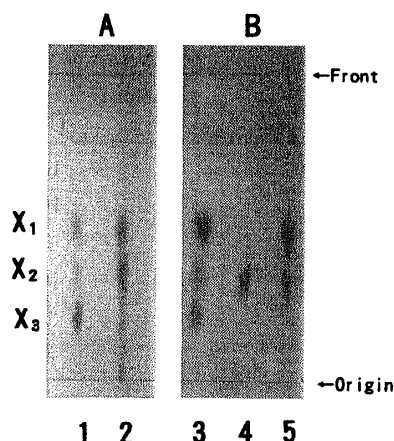


Fig. 3. Paper chromatograms of hydrolyzates produced from xylan and oligosaccharides by xylanase. A: Xylan (20 mg) was incubated with about 5 U of the enzyme in 1.0 ml of 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 30°C for 10 h. Lane 1, standard saccharides: X₁, xylose; X₂, xylobiose; X₃, xylotriose. Lane 2, incubation mixture. B: Ten mg of each oligosaccharide (xylobiose, xylotriose) was incubated with about 5 U of the enzyme in 1.0 ml of 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 30°C for 5 h, respectively. Lane 3, standard saccharides; Lane 4, incubation mixture with xylobiose; Lane 5, incubation mixture with xylotriose.

回精製された酵素はエンド型のキシラナーゼであると推定された。

Fusidium sp. BX-1 はキシラン—グリセロール培地において、キシラン単独の培地におけるより多量のキシラン分解に関する酵素を細胞外に生産した。BX-1 株のようにグリセロールと多糖類を共存させた場合に、多糖類単独の場合よりも、むしろ多量に多糖類の分解にかかわる酵素を細胞外に分泌するような酵素の生産様式を示す菌株は、これまでに報告されていないものと思う。今回、BX-1 株より得られた酵素の調べた範囲の性質は、一部のキシラナーゼで知られているように SDS の存在下でその活性が強く阻害されたり、また、水銀化合物に対してあまり阻害を受けないなどの特徴も見られるものの、これまでの多くのキシラナーゼのもっている性質¹⁻¹⁸⁾の範囲に入るものであると思われる。本酵素の酵素化学的性質の詳細については、現在 BX-1 株が生産するキシラン分解にかかわる他の 2 種類の酵素に関しても精製を試みているので、これらの精製酵素標品が得られた時点で、それらの酵素の諸性質ともあわせて比較検討を考えている。

要 約

不完全菌 *Fusidium* sp. BX-1 による培地中のキシランの分解は、グリセロールの存在下でいちじるしく促進された。BX-1 株はグリセロール—キシラン培地で複数のキシラン分解酵素を生産し、総キシラナーゼ活性はキシラン単独での培地での約 15 倍量に達した。これらの酵素の中から一種をポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一なまでに精製した。精製標品の分子量は 36,000 と算出された。本酵素はキシランをキシロースを含むキシロオリゴ糖に分解した。また、キシロトリオースをキシロースとキシロビオースに分解したが、キシロビオースとフェニル-β-キシロシドには作用しなかった。本酵素の至適 pH は 5.5, pH 4-9 において安定であった。至適温度は 60°C, 50°C において 30 分間の加熱に対しては安定であった。

本研究の遂行にあたり、試料の提供や実験にご助言下さった合同酒精株式会社小林文男氏、石崎晴記氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 松尾 勝：微生物の分離法，(山里一英，宇田川俊一，児玉 徹，森地敏樹)，p. 627-630, R&D プランニング，東京 (1986)。
- 2) Okada, H., Shinmyo, A.; Biely, P., Vrsanká, M.; Yasui, T., Marui, M., Kusakabe, I., Nakanishi, K.; Akiba, T., Horikoshi, K.; Jurase, L., Paice, M. G.; John, M., Schmidt, J.; Matsuo, M., Yasui, T.; Hayashida, S., Ohta, K., Mo, K.; Lachke, A. H.; Matsuo, M., Yasui, T.: *Methods in Enzymology*, (Wood, W. A., Kellogg, S. T.), Vol. 160, p. 632-695, Academic Press, Inc., San Diego (1988)。
- 3) Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., Saddler, J. N.: *Microbiol. Rev.*, **52**, 305-317 (1988)。
- 4) Royer, J. C., Nakas, J. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2535-2539 (1990)。
- 5) Rajaram, S., Varma, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 141-144 (1990)。
- 6) Grabski, A. C., Jeffries, T. W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 987-992 (1991)。
- 7) Viet, D. N., Kamio, Y., Abe, N., Kaneko, J., Izaki, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 445-449 (1991)。
- 8) Myburgh, J., Prior, B. A., Kilian, S. G.: *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 135-137 (1991)。
- 9) Funaguma, T., Naito, S., Morita, M., Okumura, M., Sugiura, M., Hara, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1163-1165 (1991)。
- 10) Bailey, M. J., Puls, J., Poutanen, K.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13**, 380-389 (1991)。
- 11) Smith, D. C., Wood, T. M.: *Biotechnol. Bioeng.*,

- 38, 883-890 (1991).
- 12) Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A.: *Can. J. Microbiol.*, **37**, 675-681 (1991).
- 13) Özcan, S., Kötter, P., Ciriacy, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 190-195 (1992).
- 14) Lumba, F. L., Penninckx, M. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 733-738 (1992).
- 15) Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T., Ishikawa, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 547-550 (1992).
- 16) Röthlisberger, P., Fiechter, A., Zimmermann, W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 416-419 (1992).
- 17) Rättö, M., Poutanen, K., Viikari, L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 470-473 (1992).
- 18) Nakanishi, K., Marui, M., Yasui, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 392-394 (1992).
- 19) Dobberstein, J., Emeis, C. C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 262-268 (1989).
- 20) Ikura, Y., Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3143-3145 (1987).
- 21) 藤井貴明, 大野信子, 内山 茂, 宋 淑, 篠山 浩文, 安藤昭一: 醸酵工学, **69**, 319-329 (1991).
- 22) Ohno, N., Ijuin, T., Song, S., Uchiyama, S., Shinoyama, H., Ando, A., Fujii, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 465-471 (1992).
- 23) 百瀬 勉, 向井良子, 河辺節子, 鈴木順子, 山本恭子: 分化, **11**, 956-959 (1962).
- 24) Yasui, T., Matsuo, M.: *Methods in Enzymology*, (Wood, W. A., Kellogg, S. T.), Vol. 160, p. 696-697, Academic Press, Inc., San Diego (1988).
- 25) Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 26) Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964).
- 27) Weber, K., Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 28) Kusakabe, I., Yasui, T., Kobayashi, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1355-1362 (1975).
- 29) 日下部功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **49**, 383-385 (1975).