

- 28) Kimura, N., Hirano, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1173-1179 (1988).
- 29) 小林 丘, 滝口泰之, 島原健三, 山南隆徳: 農化, **62**, 1463-1469 (1988).
- 30) 小林 丘, 鍛冶佳子, 滝口泰之, 島原健三, 山南隆徳: 農化, **62**, 1471-1474 (1988).
- 31) Shirae, H., Yokozeki, K., Kubota, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1233-1237 (1988).
- 32) Shirae, H., Yokozeki, K., Kubota, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1499-1504 (1988).
- 33) Isogai, A., Fukuchi, N., Hayashi, M., Kamada, H., Harada, H., Suzuki, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3235-3237 (1988).
- 34) Yatohgo, T., Nakata, M., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y., Yamamoto, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1485-1493 (1988).
- 35) Iizuka, M., Murata, K., Kimura, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 613-614 (1988).
- 36) Iida, H., Nakajima, T., Ichishima, E.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2313-2322 (1988).
- 37) Tomita, K., Yano, T., Kumagai, H., Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 299-304 (1988).
- 38) Yanagimoto, M., Matsumoto, K., Mori, K.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 1-6 (1988).
- 39) Yokota, A., Yamada, Y., Imai, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 27-37 (1988).
- 40) Middelhoven, W., Notermans, S.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 15-26 (1988).

(科研製薬・中研 古市 昭也)  
(科研製薬・中研 長田永三朗)

## 7. 酵 素

### Enzymes

#### 7-1 糖関連加水分解酵素

##### 7-1-1 アミラーゼ

耐熱性  $\alpha$ -amylase 遺伝子をコードしたプラスミドを有する *Escherichia coli* が生産する  $\alpha$ -amylase に対するモノクローナル抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーによる組換え体  $\alpha$ -amylase を精製した.<sup>1)</sup>

好アルカリ性 *Bacillus* sp. H-167 は、3種類の maltohexaose 生成  $\alpha$ -amylase を生産した。精製酵素はいずれも可溶性デンプンに作用して反応初期に主に maltohexaose を生産し、その生産率は25~30%に達した。<sup>2)</sup>

*Rhizopus* sp. MB 46 によるキャッサバ生デンプン分解性 glucoamylase の液体培養における生産条件を検討した。<sup>3)</sup> *Rhizopus* sp. MB 46 の液体培養における glucoamylase の生産性を向上させるために取得した 2-deoxyglucose 耐性変異株 AF-1 の培養条件を検討した。両菌株の生産する酵素の CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンは、glucoamylase 以外では同一であった。<sup>4)</sup>

*Aspergillus awamori* var. *Kawachi* の glucoamylase I (GAI) の生デンプン吸着部位 (Gp-I, 分子量 7,000) の N-および C-末端領域のアミノ酸配列は、Ala<sup>1</sup>-X-Gly-Gly-X-X-X...Ala<sup>9</sup>...Ala-Val であり、

GP-I は GAI 分子上の Ala<sup>471</sup> と Val<sup>515</sup> の間に位置することが示唆された。さらに glucoamylase の多様性発現機構は翻訳後の protease 限定加水分解によることが支持された。<sup>5)</sup>

*Dictyoglomus thermophilum* は極めて耐熱性でかつ至適 pH を酸性域に有する amylase を複数種分泌し、それらはカラム・クロマトにより、可溶性デンプンより glucose と maltose を生成する糖化型活性画分と glucose および種々のオリゴ糖 (G2~G8) を生成する液化型活性画分に分かれた。<sup>6)</sup>

$\alpha$ -cyclodextrin は 1-10 mM 以上の濃度で *Rhizopus niveus* 由来の glucoamylase の熱安定性を著しく増強した。この結果、50°C, 60°C において10日以上にわたり、maltose を加水分解した。<sup>7)</sup>

*Aspergillus niger* 起源の工業用 glucoamylase (GA) 製剤中の GA は、少なくとも6種類の GA を含んでいると考えられ、さらにそれぞれの抗血清との交差反応性の解析により、GA は大きく3つの群に分かれた。<sup>8)</sup> 本 GA 製剤より単離した6種類 (A-II~IV, B-I~III) のうち、B-I 酵素は、血清学および酵素学的に特異な酵素であった。さらに A-II 酵素は、分子量およびアミノ酸組成より、他の酵素とは異なる DNA 部位からの転写産物であることを示唆した。<sup>9)</sup>

*Chalara paradoxa* の glucoamylase を蛍光色素

fluorescein-isothiocyanate で標識し、標識 glucoamylase の各種生デンプンへの吸着を検討したところ、本酵素の生デンプンへの吸着は非特異的であった。<sup>10)</sup>

*Rhizopus niveus* の glucoamylase (isozyme D) に *Flavobacterium* sp. の endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase を作用させた結果より、本 glucoamylase 中に存在する asparagine 結合型糖鎖がそのタンパク質の安定化に大きく寄与していることを推定した。<sup>11)</sup>

*Bacillus acidopullulyticus* の pullulanase を市販粗酵素液 Promozyme 200 L から精製し、2成分 (F1 と F2) に分離した。精製 F1 と F2 の至適 pH、分子量、 $K_m$  値はそれぞれ 5.0, 115,000-116,000, 2.5 mM (glucose 等量) とほとんど同じであり、等電点、比活性、 $K_0$  値は異なり、それぞれ 5.0 と 5.2, 200 と 220 units/mg,  $2.9 \times 10^3$  と  $3.6 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$  であった。F1 と F2 は *Klebsiella pneumoniae* の pullulanase より、pullulan, glycogen  $\beta$ -limit dextrin, 可溶性モチゴメデンプンによく作用した。<sup>12)</sup>

*Arthrobacter globiformis* T6 の生産する isomaltodextranase の精製酵素は、280 nm における  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ , pI, 分子量, 至適 pH および至適温度をそれぞれ 24.6, 5.15, 69,000 (SDS-PAGE), 5.3 および 65°C に有する酸性タンパク質であり、4°C, 24時間では pH 3.0-8.0 の範囲で完全に安定であった。本酵素による dextran からの水解生成物のアノマー型は  $\alpha$ -型であり dextran に対する  $K_m$  値は 0.038% であり, isomaltitol は強力な拮抗阻害作用 ( $K_i = 0.79 \text{ mM}$ ) を示した。<sup>13)</sup> さらに本精製酵素は, isopullulanase 活性を示し, 両酵素活性の発現は単一酵素分子に帰属すると考えられた。<sup>14)</sup>

*Arthrobacter globiformis* I 42 の生産する glucodextranase の精製酵素は、280 nm における  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ , pI, 分子量, 至適 pH および至適温度をそれぞれ 18.6, 4.31, 120,000 (SDS-PAGE), 6.0 および 45°C に有する酸性タンパク質であり、4°C, 24時間処理では pH 5.5-7.5 の範囲で完全に安定であった。本酵素による dextran および isomaltose からの水解生成物のアノマー型はいずれも  $\beta$ -型を示し, dextran に対する  $K_m$  値は 0.014% であり, phenyl  $\alpha$ -D-glucoside は強力な拮抗阻害作用 ( $K_i = 1.69 \text{ mM}$ ) を示した。<sup>15)</sup>

#### 7-1-2 セルラーゼ

*Bacillus* sp. KSH-522 は、中性培地で良好に生育し, alkaline carboxymethyl cellulase を生産した。本酵素は, pH 7~10 に至適 pH 領域を有し, pH 7 で30分

間処理しても 50°C まで安定であり, 不溶性 cellulose 基質に対する活性は微弱であった。本酵素は, 衣料用洗剤組成物である界面活性剤, proteolytic enzyme およびキレート剤存在下でも安定にその酵素活性を示した。<sup>16)</sup>

糸状菌 Y-94 の生産する Avicelase II は, 分子量, 等電点, Avicel に対する至適 pH, 安定 pH 域および至適温度をそれぞれ 56,000~68,000, 4.4, 5.3, 4.1-6.0 および 62°C に有し, 61°C, 10分間処理で安定であり,  $\text{Hg}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  により阻害された。本酵素は, endoglucanase に属すると考えられた。<sup>17)</sup>

19種類の myxomycete の表面培養において, CMC- および xylan 分解酵素はすべて認められ, *Stemonitis axifera* は高エステル化 pectin を分解した。細菌を同伴する myxomycete は pectin 分解と汚紙崩壊活性を示すが, 無菌の状態の myxomycete は, pectinase と  $\text{C}_1$ -cellulase を有していなかった。<sup>18)</sup>

#### 7-1-3 $\beta$ -グルコシダーゼ

*Penicillium herquei* Banier and Sartory の生産する 2種類の  $\beta$ -glucosidase (G1, G2) は, 分子量, 糖含有量および等電点をそれぞれ 125,000 と 122,000, 12.7% と 16.1% および 5.02 と 5.24 に有し, G1 および G2 とも至適 pH は 4.0~4.5, 至適温度は 60°C であった。G1 および G2 は *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, salicin, cellobiose, laminaribiose, gentiobiose, laminarin および CM-cellulose を分解し, さらに糖転移作用を有していた。<sup>19)</sup>

#### 7-1-4 イヌリナーゼ

*Cryosporium pannorum* AHU 9700 の生産する inulinase の粗酵素は, 反応至適 pH および至適温度をそれぞれ 5.6 および 50°C に有し, 50°C 以下, pH 4.5~7.0 の範囲で安定であり, exo 型および endo 型の inulinase から構成されているものと推定した。<sup>20)</sup>

*Penicillium purpogenum* var. *rubrisclerotium* (HOK-1, FERM P-8705) の菌体外 endo 型 innulinase の精製酵素は, 分子量を 64,000, 等電点を pH 3.6 に有しており, 本酵素の活性部位は, subsite 構造を有すると考えた。<sup>21)</sup>

#### 7-1-5 マンナーゼ

*Penicillium purpurogenum* No. 618 の菌体外精製  $\beta$ -mannanase により Konjac glucomannan を加水分解し, 7種のオリゴ糖を単離し, 生成糖の構造から, Konjac glucomannan に対する本酵素の作用様式につき考察した。<sup>22)</sup>

好アルカリ性 *Bacillus* sp. (AM-001) が菌体外に生産する3種の精製  $\beta$ -mannanase (M-I, M-II, M-III) について、分子量 (58, 59, 42 K), 至適 pH (9.0, 9.0, 8.5), 至適温度 (60, 60, 65°C) 等を求めた。M-I, M-II および M-III は、mannotriose を最小基質とした。<sup>23)</sup>

#### 7-1-6 $\beta$ -マンノシダーゼ

好アルカリ性 *Bacillus* sp. (AM-001) の菌体内  $\beta$ -mannosidase を精製し、酵素標品の分子量 (93 K), 至適 pH (6.0), 至適温度 (50°C) 等を求めた。本酵素は、単糖より成る合成基質では、*p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-mannopyranoside にのみ作用し、マンノオリゴ糖に作用して最終生成物として mannose を生成した。<sup>24)</sup>

#### 7-1-7 ガラクタナーゼ

*Penicillium citrinum* の生産する galactanase は、大豆 arabinogalactan の  $\beta$ -1, 4-galactoside 結合を endo 型で水解するとともに、各種受容体の存在下では、糖転移反応も触媒した。本酵素は、一級アルコール類、ジオール類、glycerol およびその誘導体、catechol, 糖アルコール類、単糖類などを受容体として、転移生成物を与えた。<sup>25)</sup>

#### 7-1-8 $\beta$ -ガラクトシダーゼ

*Bacillus macerans* (IFO 3490) の生産する菌体外  $\beta$ -galactosidase は、分子量約80,000の subunit 4個から成り、最適 pH を6.5, 等電点を pH 4.4 に有し、pH 6~9, 37°C 以下では安定であった。本酵素の Km 値は、lactose と *p*-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside に対して、それぞれ30 mM と2 mM であった。本酵素は、低濃度の  $\text{Cu}^{2+}$  により非拮抗的に阻害された。<sup>26)</sup>

*Kluyveromyces lactis* KY5466 から誘導した lactase の生産性が2~2.7倍に増加した変異株は、糖をフィードする方法で51 ジャーファーマンターで培養したところ、48時間で155 U/ml の lactase を生成した。<sup>27)</sup>

#### 7-1-9 キシラナーゼ

糸状菌 Y-94 株の生産する3種類の xylanase (Xn-A, Xn-B および Xn-C) のキシロオリゴ糖 (Xn) および還元型キシロオリゴ糖 (Xn-OH) に対する作用を検討した。3種類の酵素とも X2 には作用せず、X3 の分解は各酵素で差が認められ、X4 以上は速やかに分解された。Xn-OH の分解される結合は非還元末端より2番目以降であり、さらに、これらの酵素の subsite の大きさを5 xylose 単位と推定した。<sup>28)</sup>

#### 7-1-10 キシロシダーゼ

$\alpha$ -xylosidase を生産する *Bacillus* 属の2菌株, No.

208-918-1 および No. 693-1 が土壌中より分離された。No. 693-1 の生産する  $\alpha$ -xylosidase は、methyl  $\alpha$ -D-xylopyranoside などにより誘導された。<sup>29)</sup>

*Aspergillus niger* IFO 6662 の生産する  $\beta$ -xylosidase は、alkyl  $\beta$ -xyloside の合成に優れた酵素であった。<sup>30)</sup>

#### 7-1-11 その他

*Cryptococcus albidus* G1R 6001 の菌体外 polygalacturonase は、分子量45,000, 等電点6.8, 最適 pH 5.6, 最適温度 45°C の endo 型酵素であった。<sup>31)</sup>

微生物 chitinase 製品 (*Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces* sp., *Streptomyces griseus*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* およびカビキナーゼ) は、ca. 20~45% *N*-acetylated chitosan をよく分解し、chitosan の脱アセチル化度が減少するに従って分解されやすくなり、これら chitosan の分解は酵素標品の chitinase 活性の高いものほど顕著であった。<sup>32)</sup>

*Bacillus circulans* MH-K1 の生産する chitosanase の精製標品は、分子量, chitosan に対する Km 値および pI をそれぞれ 30,000, 0.63 mg/ml および 9.2 に有し、至適反応条件は pH 6.5, 50°C であり、pH 4.0~9.0 および 0~40°C において安定であった。本酵素は、その作用を chitosan の脱アセチル化度に依存しており、endo 型であった。本酵素の最小基質は、glucosamine の tetramer であった。<sup>33)</sup>

*Mucor hiemalis* は、動物起源の糖タンパクに存在する複合型糖鎖に作用する新規な endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase を生産した。<sup>34)</sup>

## 文 献

- 1) Kamihira, M., Taniguchi, M., Iijima, S., Kobayashi, T.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 625-631 (1988).
- 2) Hayashi, T., Akiba, T., Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 443-448 (1988).
- 3) Nishise, H., Fuji, A., Ueno, M., Vongsuvanlert, V., Tani, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 397-402 (1988).
- 4) Tani, Y., Fuji, A., Nishise, H.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 545-551 (1988).
- 5) Hayashida, S., Nakahara, K., Kuroda, K., Kamachi, T., Ohta, K., Iwanaga, S., Miyata, T., Sakaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 273-275 (1988).
- 6) Kobayashi, Y., Motoike, M., Fukuzumi, S., Ohsima, T., Saiki, T., Beppu, T.: *Agric. Biol.*

- Chem.*, 52, 615-616 (1988).
- 7) Ezure, Y., Maruo, S., Kojima, M., Yamashita, H., Sugiyama, M.: *Agric Biol. Chem.*, 52, 1073-1074 (1988).
  - 8) Ono, K., Shintani, K., Shigeta, S., Oka, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1689-1698 (1988).
  - 9) Ono, K., Shintani, K., Shigeta, S., Oka, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1699-1706 (1988).
  - 10) Monma, M., Kainuma, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2087-2089 (1988).
  - 11) Takegawa, K., Inami, M., Yamamoto, K., Kumagai, H., Tochikura, T., Mikami, B., Morita, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2491-2492 (1988).
  - 12) Kusano, S., Nagahata, N., Takahashi, S., Fujimoto, D., Sakano, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2293-2298 (1988).
  - 13) Okada, G., Takayanagi, T., Sawai, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 495-501 (1988).
  - 14) Okada, G., Takayanagi, T., Miyahara, S., Sawai, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 829-836 (1988).
  - 15) Okada, G., Unno, T., Sawai, T.: *Agric Biol Chem*, 52, 2169-2176 (1988).
  - 16) Kawai, S., Okoshi, H., Ozaki, K., Shikata, S., Ara, K., Ito, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1425-1431 (1988).
  - 17) Yamanobe, T., Mitsuishi, Y., Yagisawa, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2493-2501 (1988).
  - 18) Kobilansky, C., Schinner, F.: *J. Gen. Appl. Microbiol*, 34, 321-332 (1988).
  - 19) Funaguma, T., Hara, A.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 749-755 (1988).
  - 20) Xiao, R., Tanida, M., Takao, S.: *J. Ferment. Technol.*, 66, 553-558 (1988).
  - 21) Onodera, S., Shiomi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2569-2576 (1988).
  - 22) Kusakabe, I., Park, G. G., Kumita, N., Yasui, T., Murakami, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 519-524 (1988).
  - 23) Akino, T., Nakamura, N., Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 773-779 (1988).
  - 24) Akino, T., Nakamura, N., Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1459-1464 (1988).
  - 25) Nakano, H., Takenishi, S., Watanabe, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1319-1322 (1988).
  - 26) Miyazaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 625-631 (1988).
  - 27) Yoshida, H., Araki, K., Kawai, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 951-955 (1988).
  - 28) Mitsuishi, Y., Yamanobe, T., Yagisawa, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 921-927 (1988).
  - 29) Zong, N., Nakanishi, K., Yasui, T., Yamasato, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3043-3050 (1988).
  - 30) Shinoyama, H., Yasui, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2375-2377 (1988).
  - 31) Tanabe, H., Kamishima, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 611-612 (1988).
  - 32) Ohtakara, A., Izume, M., Mitsutomi, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3181-3182 (1988).
  - 33) Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, K., Ando, A., Fujii, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34, 255-270 (1988).
  - 34) Kadowaki, S., Yamamoto, K., Fujisaki, M., Kumagai, H., Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2387-2389 (1988).
- (7-1 敷島紡績 上山英夫)
- ## 7-2 トランスフェラーゼ
- Arthrobacter globiformis* Cll-1 株の生産する inulin fructotransferase を精製した。本酵素の分子量は SDS-PAGE により 45,000, ゲルろ過により 50,000, 等電点は 5.1 であった。反応至適 pH は 5.0, 反応至適温度は 55°C, pH 5 で 75°C, 20 分間の加熱に対しても安定であった。<sup>35)</sup>
- Streptococcus bovis* No. 148 は sucrose- および glucose- 培地で dextransucrase を生産した。glucose- 培地から調製した酵素は種々の Sephadex ゲルに特異的に吸着したが, Dextran T-500, T-2000 と共に処理すると最早 Sephadex に吸着しなくなった。<sup>36)</sup>
- ## 7-3 キシロースイソメラーゼ
- メタノール酵母 *Candida boidinii* No. 2201 の xylose 生育菌体から xylose isomerase を精製した。本酵素は 65,000 のダイマーサブユニットからなり分子量は 130,000 であった。酵素活性の最適 pH と温度は 4.5 と 37~45°C で  $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Co^{++}$  により促進された。xylose と glucose に対する  $K_m$  値は  $5.6 \times 10^{-1} M$ ,  $4.1 \times 10^{-1} M$  で  $V_{max}$  値は  $5.8 \times 10^2$ ,  $3.3 \times 10^2 \mu mol/min/mg$  であった。<sup>37)</sup>
- ## 7-4 細胞壁溶解酵素
- Trichoderma viride* の生産するセルラーゼ II-b を精製し, その特異な縮合・水解作用の機作を明らかにした。本酵素は低濃度の  $\beta$ -cellobiose を縮合して cellotetraose を合成し, 縮合作用の供与体基質には厳密に規定された  $\beta$ -アノマーのみが要求されることを明らかにした。本酵素は多機能万能型の新規 cellulase と考えた。<sup>38)</sup> さらに cellulase III を精製した。本酵素は *exo*-cellobiohydrazase と相同であった。本酵素を各

種 cellulose 基質に作用させると多量の glucose を生成し、この機構は  $\beta$ -glucosidase の関与なしに本酵素自身の  $\beta$ -cellobiose に対する特異な縮合・水解作用の結果であることを明らかにした。<sup>39)</sup>

*Rhodococcus erythropolis* の菌体を溶解する3種の酵素、C-2, C-4, C-5 を *Flavobacterium* species SH-548 の培養液から精製した。C-4, C-5 の分子量は26,000で casein に対して溶解性を示した。C-2 の分子量は36,000で casein に対して作用しなかったが、*R. erythropolis* 菌体に対する溶解活性は C-4, C-5 より高かった。<sup>40)</sup>

*Robillarda* sp. Y-20 の生産する cellulase, CMCase I, を精製した。分子量は約56,000, 等電点は3.80, CMC に対する加水分解活性の至適 pH は5.0, 至適温度は60°C であった。本酵素は cellotriose 以上のセロオリゴ糖に作用して主に cellobiose を生成し、CMC からは glucose と cellobiose を生成した。Avicel には作用しなかった。<sup>41)</sup>

土壌から分離した *Geotrichum candidum* HM-11 は2種の endocellulase (I, II) を産生した。I は不溶性セルロース基質に対し吸着性と崩壊性を示したが、II は吸着性も崩壊性も示さなかった。<sup>42)</sup> この endocellulase I を subtilisin によって限定分解すると、可溶性の CM-cellulose 分解活性を持ち、Avicel に対する吸着能および崩壊能を持たない subtilisin-修飾 endo-cellulase (分子量80,000) へと変化した。N-bromosuccinimide で酸化すると cellulase 活性を喪失したが、吸着能は保持していたので endocellulase I には天然 cellulose に吸着するための親和部位と活性部位が離れて存在すると考えた。<sup>43)</sup>

*Hansenula anomala* J45-1 の生菌体を唯一の炭素源、窒素源として培養した *Rarobacter faecitabidus* YLM-1 の培養上澄液を100倍に濃縮すると溶菌活性が検出された。この上澄液には raminalinase, mannanase, protease 活性が検出された。<sup>44)</sup>

土壌より分離した *Flavobacterium* sp. を酵母エキスを添加した培地で培養すると、酵母エキス濃度に応じて endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase の生産が増大した。本酵素は、硫酸分画、DEAE-sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーによって容易に精製された。<sup>45)</sup>

*Pseudomonas marginalis* N-6301 株は培養中に mitomycin C(0.5  $\mu$ g/ml) を添加すると pectin lyase を大量に生産した。分子量は32,000で *Erwinia carotovora* の酵素とは性質が類似していたが免疫的には交

差性はなかった。<sup>46)</sup>

*Polyspondylium palidum* アメーバから *Micrococcus lysodeikticus* を溶解する2種類の溶菌酵素(I, II) を分離した。酵素Iは等電点8.3の塩基性タンパク質で、分子量は14,000であった。酵素IIは等電点4.1の酸性タンパク質で分子量は22,000であった。両酵素共に N-acetylmuramidase であった。<sup>47)</sup>

*Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A, 半数体野生株に、nitrosoguanidine による変異誘発を行い、zymolyase 感受性の強い変異株、N3 および N3-8 を得た。両変異株とも 2M NaCl によって、野生株と比較して2~6倍のタンパク質が抽出された。また、アルカリ可溶  $\beta$ -グルカン画分は変異株において減少し、逆にアルカリ不溶画分は増加していた。<sup>48)</sup>

*Trichoderma viride* B1A の生産する真菌類細胞壁溶解酵素系の主成分である  $\beta$ -1, 3-glucanase を精製した。本酵素は分子量40,000で、pH 5 に最適 pH を有し作用最適温度は55°C であった。カビ、酵母および担子菌から容易にプロトプラストを生成した。<sup>49)</sup>

## 7-5 プロテアーゼ

大腸菌 HB101 株の無細胞抽出液より aminopeptidase N を約300倍に精製した。精製酵素標品は arylamidase と peptidase 活性を示した。酵素の至適 pH は7.5, 分子量は80,000で単量体で存在し、pI は5.7 であった。<sup>50)</sup>

海水から分離した *Vibrio harveyi* の培養液から protease を精製した。分子量は84,000で21,000のサブユニットの四量体からなる。反応至適 pH は8.0, 温度は55°C であり、40°C 以下で安定であった。本酵素はアルカリ性金属プロテアーゼであった。<sup>51)</sup>

海水から分離した *Vibrio splendidus* の培養液から protease を精製した。分子量は50,000の単量体で、反応至適 pH は8.0, 温度は55°C であり、35°C 以下で安定であった。阻害剤の実験結果から、本酵素はアルカリ性金属プロテアーゼであった。<sup>52)</sup>

海水から分離した *Vibrio harveyi* FLN-108 は培養液中に2つの protease (I, II) を生産した。I は分子量49,000の単量体、II は23,000のサブユニットの二量体で分子量は46,000であった。この2つの酵素の至適 pH は8~9, 温度は50°C であり、45°C 以下で安定であった。両酵素共にアルカリ性金属プロテアーゼであった。<sup>53)</sup>

レニン基質の tetradecapeptide を各種菌類 aspartic,

acidic protease の基質として特異性を検討した。 *Mucor*, *Rhizopus* の各酵素と *Aspergillus*, *Penicillium* の酵素は特異性が類似していた。 *Scytalidium* のタイプ A-1, B 酵素, *Cladosporium* 酵素, 担子菌 *Pycnoporus sanguineus* 酵素, *Rhodotorula* 酵素はそれぞれ異なった特異性を示した。<sup>54)</sup>

*Irpex lacteus* から凝乳酵素画分を調製し, 仔牛レンネット代替品として評価するために, 繊維状チーズの試作を行った。<sup>55)</sup>

*Aspergillus* aspartic protease は Boc-LSTR-MCA, Boc-IEGR-MCA を加水分解し, R-MCA を遊離した。 R-MCA に aminopeptidase を作用させ蛍光法による本酵素の活性測定法を確立した。<sup>56)</sup>

*Aspergillus sojae* の serine protease II は蛍光基質 Suc-LLVY-MCA, Boc-VLK-MCA をよく加水分解した。 発色基質は Suc-AAVA-pNA, Suc-AAPF-pNA, To-GPK-pNA, z-GPCit-pNA をよく加水分解した。<sup>57)</sup>

菌体外プロテアーゼを生産する好熱性嫌気性菌 C-17-70 株を純粋分離した。 本菌は Gram 陰性, 非運動性の桿菌で胞子を形成せず 45°C から 71°C に生育温度範囲を有していた。 本菌を正基準株として, 新種 *Thermobacteroides leptospartum* を提案した。<sup>58)</sup>

酸性温泉より分離した中等度好熱性細菌, *Bacillus novo* sp. MN-32 株の生産する酸性 protease を精製した。 本酵素は作用至適 pH 3, 作用至適温度 70°C を示し, 80°C, 10分間の熱処理でも59%の活性残存率を示した。 また, 各種 protease 阻害剤にも阻害されず新規な耐熱性酸性 protease であった。<sup>59)</sup>

*Thermus aquaticus* YT-1 の菌体抽出液から耐熱性 aminopeptidase を分離精製した。 本酵素の分子量は約108,000で, 2個のサブユニットから構成されていた。 本酵素活性の至適 pH は8.5~9.0, 至適温度は75~80°C で, 80°C で20時間加熱処理した後でも約60%の残存活性を有した。<sup>60)</sup>

Aminopeptidase P の新測定法を開発し, この活性測定法を用い, *E. coli* HB 101 の菌体より aminopeptidase P を精製した。 2種類の酵素, APP-I と APP-II が得られ, 分子量, 至適 pH はそれぞれ350,000と210,000, 8.0と9.0であった。 両酵素とも X-Pro (X=アミノ酸) 結合に作用するが, APP-I は APP-II に比べ Pro-Pro 結合を切断しにくかった。<sup>61)</sup>

食品醸造に使用されている各種糸状菌の  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase (GGT) の分布と性質を検討した。 供試菌株中, 最も GGT 活性の高かった *Penicillium*

*roqueforti* (IFO 4622) の本酵素を部分精製した。 至適 pH は8~9で, 熱に不安定, 2~16%の食塩存在下で活用化された。<sup>62)</sup>

基質として Leu-Gly を用い, *Streptomyces cellulosa* の生産する protease の融合作用ならびに加水分解作用に対する各種試薬の影響を検討した。 その結果, 本酵素は serine protease に属し, chymotrypsin 様の作用を示す新しいタイプの酵素と考えられた。<sup>63)</sup>

高度耐熱性中性 protease 生産菌 *Bacillus stearothermophilus* MK232 を土壌より分離し, 数度の変異処理により MK232 より2倍の生産性の向上した変異株 YG 185 を取得した。 精製酵素の分子量は約34,000, 至適温度約70°C, 至適 pH は7.5で, pH 5~10 および 70°C 以下では非常に安定であった。<sup>64)</sup>

醤油種麹から分離した *Aspergillus oryzae* MA-27-IM 株の菌体外画分および菌体内画分に含まれる glutaminase を精製した。 両酵素共分子量が等しく, 一般的性質も同じであったので同一タンパク質と考えた。 両酵素は各種の  $\gamma$ -グルタミル化合物に対して活性を示したが, asparaginase 活性は示さなかった。<sup>65)</sup>

*Aspergillus niger* LCF No. 9 による semi-alkaline protease はタンパク含有基質, 特に大豆ケーキを基質として誘導的に生産された。 パイロットスケールでの本酵素の安定した生産は, bonzoyl argine *p*-nitroanilide を基質とし, 窒素ガスを注入することによって達成した。<sup>66)</sup>

小麦グルテンを酸処理 (1.3N HCl で 100°C, 30分間加熱) 後, *Aspergillus oryzae* 460菌の protease により酵素分解を行うと, 無処理に比べて glutamic acid の生成が増加した。 この酸処理法を protease 製剤を利用した醤油醸造に応用すると, グルタミン酸/全窒素が約31%増加し, 従来の麹法の値に近づいた。<sup>67)</sup>

## 7-6 リパーゼ

*Penicillium cyclopium* M1 の培養液より新規な lipase を精製した。 本酵素の分子量は約110,000, 同一のサブユニット2個で構成されていた。 pI は pH 3.84, 反応の最適 pH は6.0であった。 本酵素を glycerol kinase,  $\alpha$ -glycerophosphate oxidase と共役させて血清の中性脂肪の定量に利用できた。<sup>68)</sup>

*Humicola lanuginosa* No. 3 の高温性 lipase を Amberlite XAD-7 樹脂へ吸着固定後, glutaraldehyde で架橋処理することによって固定化した。 本固定化酵素は, 固定化後の活性が比較的高いこと, 最適温

度が約 10°C 高温側へ移行する, pH 安定性が増加すること, 2~3 週間以上安定であるなどの利点があった。<sup>69)</sup>

*Humicola lanuginosa* No. 3 由来の lipase の stearic acid によるアシドリシス反応は, 0.5%水分量を含む *n*-hexan 系で最適であった。また, Amberlite XAD-7 に吸着固定した場合が最も高いアシドリシス活性を有していた。<sup>70)</sup>

*Pseudomonas fragi* 22.39B の生産する lipase は 3 級のアルコールあるいは枝鎖を有する脂肪酸をエステル化できず, また活性は脂肪酸の炭素鎖が長くなるほど高くなった。本酵素はグリセライド合成で位置特異性を有していることが確認された。<sup>71)</sup> 本菌由来の lipase 標品のうちで粗酵素は *n*-hexane, *iso*-octane 中で, polyethyleneglycol 修飾酵素は benzene, *tri*-chloroethane 中で高い活性を示した。<sup>22)</sup> 粗酵素標品の *n*-hexane 中でのエステル合成において, 1 級あるいは 2 級のアルコールおよび直鎖脂肪酸は基質となりえたが, 3 級アルコールおよび枝鎖を有する脂肪酸は反応しなかった。本酵素は *n*-hexane 中での反応において, 繰り返し使用することが可能であった。<sup>73)</sup>

*Geotrichum candidum* の lipase を glutalaldehyde を介して polyarylamine ビーズに結合して, 熱, pH, 有機溶媒に対する安定性の向上した固定化 lipase を調製した。<sup>74)</sup>

*Aspergillus niger* の lipase を精製した。本酵素は等電点 4.1, 分子量 35,000 の糖タンパク質で, オリーブ油を基質としたときの作用最適 pH は 4.5~5.5, pH 安定域は 3~10.5 であった。<sup>75)</sup>

*Rhizopus delemar* と *R. arrhizus* の lipase は, 広範囲の分子量域において homopolyester よりも低融点の copolyester に対して高い分解度を示した。 *Candida cydindracea* やブタ膀胱の lipase およびブタ肝臓のエステラーゼは両者に対して同程度の分解度を示した。<sup>76)</sup>

*Torulospira delbrueckii* の細胞洗浄液から水溶性 phospholipase B を精製した。分子量は 170,000~200,000 と推定され, 等電点は 4.0, pH 2.5 と pH 7.5 にそれぞれ最適活性を有した。精製酵素は lysophospholipase 活性と phospholipase B 活性を酸側で 37:1, アルカリ側で 73:1 の割合で有した。<sup>77)</sup>

*Pseudomonas* 属に属する菌株 f-B-24 のヒマシ油を加水分解する lipase を精製した。精製酵素の分子量は 30,000, 最適 pH および温度はそれぞれ pH 7,

60°C であった。pH 7, 30 分の条件で 35°C まで安定であり, 4°C, 22 時間の条件で pH 9~10 で安定であった。<sup>78)</sup>

*Rhizopus chinensis* の菌体内 lipase 活性を高めるためには有機窒素源を主成分とする培地に oleic acid, olive oil, tea oil の添加が必須であった。本菌を Bio-mass Support Particles に固定化した乾燥菌体の olive oil と methyl stearate のエステル交換反応活性は菌体の活性に比べて 4~7 倍増幅され, 本方法はエステル交換反応の工業化に有利なプロセスを提供できると期待された。<sup>79)</sup>

## 文 献

- 35) Haraguchi, K., Kishimoto, M., Seki, K., Hayashi, K., Kobayashi, S., Kainuma, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 291-292 (1988).
- 36) Hayashi, T., Ioroi, R., Ohara, N., Kozaki, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34, 213-219 (1988).
- 37) Vongsuvanlert, V., Tani, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1817-1824 (1988).
- 38) Okada, G., Tanaka, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 617-619 (1988).
- 39) Okada, G., Tanaka, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2981-2984 (1988).
- 40) Hatakeyama, S., Shinke, R., Aoki, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 935-941 (1988).
- 41) Yoshigi, N., Taniguchi, H., Sasaki, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1389-1396 (1988).
- 42) Mo, K., Hayashida, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1675-1682 (1988).
- 43) Mo, K., Hayashida, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1683-1688 (1988).
- 44) Saito, K., Hasuo, T., Yamamoto, N., Tadenuma, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1849-1850 (1988).
- 45) Kadowaki, S., Takegawa, K., Yamamoto, K., Kumagai, H., Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2105-2106 (1988).
- 46) Sone, H., Sugiusa, J., Itoh, Y., Izaki, K., Takahashi, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3205-3207 (1988).
- 47) Fujii, O., Imai, S., Yamamoto, M., Sugisawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3057-3066 (1988).
- 48) Nakajima, T., Konno, R., Nishihara, H., Matsuda, K.: *J. Ferment. Technol.*, 66, 245-250 (1988).
- 49) 小川喜八郎, 外山信男, 杉田浩一: 醸酵工学, 66, 385-392 (1988).
- 50) Yoshimoto, T., Tamesa, Y., Gushi, K., Murayama, N., Tsuru, D.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 217-225 (1988).
- 51) Fukasawa, S., Nakamura, K., Kamii, A.,

- Ohyama, Y., Osumi, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 435-441 (1988).
- 52) Fukasawa, S., Aoki, S., Gawazawa, N., Osumi, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 427-433 (1988).
- 53) Fukasawa, S., Nakamura, K., K., Miyahira, M., Kurata, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3009-3014 (1988).
- 54) Majima, E., Oda, K., Murao, S., Ichisima, E.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 787-793 (1988).
- 55) Kikuchi, E., Kobayashi, H., Kusakabe, I., Murakami, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1277-1278 (1988).
- 56) Takeuchi, M., Ueno, Y., Ichishima, E.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1279-1280 (1988).
- 57) Iida, H., Takeuchi, M., Ichishima, E.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1281-1282 (1988).
- 58) Toda, Y., Saiki, T., Uozumi, T., Beppu, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1339-1344 (1988).
- 59) Murano, S., Ohkuni, K., Nagao, M., Oda, K., Shin T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1629-1631 (1988).
- 60) Minagawa, E., Kaminogawa, S., Matsuzawa, H., Ohta, T., Yamauchi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1755-1763 (1988).
- 61) Yoshimoto, T., Murayama, N., Tsuru, D.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1957-1963 (1988).
- 62) Tomita, K., Yano, T., Kumagai, H., Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2373-2374 (1988).
- 63) Muro, T., Tominaga, Y., Okada, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2627-2628 (1988).
- 64) Kubo, M., Murayama, K., Seto, K., Imanaka, T.: *J. Ferment. Technol.*, 66, 13-17 (1988).
- 65) Yano, T., Ito, M., Tomita, K., Kumagai, H., Tochikura, T.: *J. Ferment. Technol.*, 66, 137-143 (1988).
- 66) Pourrat, H., Barthomeuf, C., Texier, O., Pourrat, A.: *J. Ferment. Technol.*, 66, 383-388 (1988).
- 67) Nakadai, T., Nasuno, S.: *J. Ferment. Technol.*, 66, 535-544 (1988).
- 68) Isobe, K., Akiba, T., Yamaguchi, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 41-47 (1988).
- 69) Omar, I. C., Saeki, H., Nishio, N., Nagai, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 99-105 (1988).
- 70) Omar, I. C., Nishio, N., Nagai, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2923-2925 (1988).
- 71) Nishio, T., Chikano, T., Kamimura, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1203-1208 (1988).
- 72) Nishio, T., Kamimura, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2631-2632 (1988).
- 73) Nishio, T., Kamimura, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2933-2935 (1988).
- 74) Sugihara, A., Shimada, Y., Tominaga, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1589-1590 (1988).
- 75) Sugihara, A., Shimada, Y., Tominaga, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1591-1592 (1988).
- 76) Tokiwa, Y., Suzuki, T., Takeda, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1937-1943 (1988).
- 77) Kuwabara, Y., Maruyama, M., Watanabe, Y., Tanaka, S., Takakuwa, M., Tamai, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 2451-2458 (1988).
- 78) Yamamoto, K., Fujiwara, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3015-3021 (1988).
- 79) Nakashima, T., Fukuda, H., Kyotani, S., Morikawa, H.: *J. Ferment. Technol.*, 66, 441-448 (1988).

(7-2~7-6 理研 北田牧夫)

#### 7-7 アミノ酸関連酵素

*Pediococcus pentosaceus* IFO 3182 の glutamate racemase を調べた。本酵素は活性発現に補酵素類を要求せず、平衡定数1.05で、D-および L-glutamate に特異的に作用し、L- $\alpha$ -aminoadipate によって拮抗的に阻害された。また、各種のチオール試薬によっても明瞭に阻害された。<sup>80)</sup>

Ammonia を制限して培養した絶対嫌気性菌 *Bacteroides fragilis* から NAD (P)<sup>+</sup> 依存 glutamate dehydrogenase の高活性型と低活性型とを精製した。高活性型および低活性型酵素の比活性はそれぞれ32.3および 5.9  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein で、分子量は両酵素とも290,000、等電点、至適 pH、 $K_m$  値、アミノ酸組成なども同一であった。しかし、両酵素は補酵素に対する親和性が違っていた。<sup>81)</sup>

*Alcaligenes* sp. F-137 の 5-oxo-L-pyroglutamate (5-OPG) hydrolase を精製した。本酵素は分子量 106,000~126,000で、沈降係数 ( $S_{20,w}$ ) 6.82S、等電点 pH 5.1、至適 pH 7.8、至適温度 50°C を示し、 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$  および ATP 存在下に 5-OPG を化学量論的に水解した。なお、5-OPG および ATP に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $7.0 \times 10^{-2} \text{ M}$  および  $3.2 \times 10^{-1} \text{ M}$  であった。<sup>82)</sup>

*Aspergillus oryzae* MA-27-IM の菌体外 glutaminase (Gase) は  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GTP) 活性を持つことを見出した。GTP 活性に対する温度、pH、各種試薬の影響は Gase 活性に対するそれらとほぼ同様であった。なお、GTP は  $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide を  $\gamma$ -glutamyl 供与体として利用し、各種のC末端 glycine 残基を持つペプチドへ転位させたが遊離のアミノ酸へは転位させなかった。<sup>83)</sup>

*Escherichia coli* B の  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase を調べた。本活性は *p*-CNB, *N*-EMI, IAA などの SH 基修飾剤の影響は全く受けず、活性中心に SH 基は含まれないと判断された。この結果は以前の報告とは違っており、活性測定法の差によるものと考えられた。<sup>84)</sup>

$\gamma$ -Polyglutamate を分解して glutamate を生成する *Aspergillus* 属菌を検索し、*A. oryzae* N-2 株を見出した。本菌の当該酵素活性は至適 pH 4.5~5.0, 至適温度 40°C で、その反応形式は *exo* 型であった。<sup>85)</sup>

Aspartate aminotransferase 活性の強い好熱性細菌を検索し、*Bacillus* sp. YM-2 を見出した。本菌の当該酵素は動物や *Escherichia coli* のそれと基礎的性質において類似していたが、耐熱性ははるかに高かった。<sup>86)</sup>

*Pseudomonas putida* の L-methionine  $\gamma$ -lyase を調べた。本酵素は4個の等しいサブユニットから構成され、1モル当たり16モルの cystein 残基を持ち、その8個は分子内部に埋れていた。残りの内の2個はきわめて反応性に富み、2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid でシアニ化されて  $\alpha$ ,  $\gamma$ -脱離反応の95%,  $\alpha$ ,  $\beta$ -脱離反応の60%がそれぞれ失活したが 2-mercaptoethanol で再活性化された。なお、括抗阻害剤 L-norleucine はこのシアニ化を緩慢にした。<sup>87)</sup>

*Hansenula schneegii* の kynurenine aminotransferase は L-vinylglycine (Vg) の脱アミノ反応を触媒し、 $\alpha$ -ketobutylate と ammonia とを生成した。この反応は進行にともなって酵素を不可逆的に不活性化し、VG に対する見掛けの  $K_m$  値は脱アミノ反応でも酵素不活化反応でもほぼ同一であった。また、アポ酵素は両反応とも触媒しなかった。これらの結果から、VG は本酵素に対する酵素自殺基質と考えられた。<sup>88)</sup>

## 7-8 酸化還元酵素

Glycerol に生育した *Hansenula ofunaensis* の3種の NAD<sup>+</sup> 依存 glycerol dehydrogenase (GDH) I-1, I-2 および II を調べた。GDH I-1 および I-2 の glycerol 酸化活性は基質濃度が高いときにだけ認められたが GDH II は基質濃度が低いときにも認められ、GDH I-1, I-2 および II の glycerol に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $5.6 \times 10^{-1}$  M, 2.9 M および  $1.6 \times 10^{-1}$  M であった。なお、I-2 は本菌が methanol に生育したときに誘導される dihydroxyacetone reductase であり、より嫌氣的に生育したときに増加し、高濃度の

NaCl や KCl の存在下に減少したが、glycerol の存在は影響を与えなかった。<sup>89,90)</sup>

*Cryptococcus lactativorus* の aldose reductase を精製した。本酵素は熱安定性が高く、30°C および 50°C で活性半減期はそれぞれ 800 h および 14 h であった。また、D-xylose に対して最も活性が強く、補酵素として NADH あるいは NADPH を要求し、D-Xylose に対する  $K_m$  値および  $V_{max}$  はそれぞれ  $8.6 \times 10^{-3}$  M および 20.8 units/mg protein であった。<sup>91)</sup>

*Candida boidinii* No. 2201 の sorbitol dehydrogenase を精製した。本酵素は sorbitol 以外に D-mannitol をも酸化し、D-fructose 以外に D-xylulose および D-ribulose をも還元した。Sorbitol および D-fructose に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $7.7 \times 10^{-3}$  M および  $2.63 \times 10^{-1}$  M, また、 $V_{max}$  はそれぞれ 301  $\mu$ mol/min/mg protein および 384  $\mu$ mol/min/mg protein であった。<sup>92)</sup>

アミン類質化性菌として土壌中から分離した *Pseudomonas* sp. の amine dehydrogenase を cytochrome *c* 複合体として結晶化した。本酵素は分子量 100,000 で、補欠分子族は結合型 pyrroloquinoline quinone であった。なお、本酵素は幅広い基質特異性を示し、pH 安定性や熱安定性も優れていることから生体内アミンの定量に応用できるものと考えられた。<sup>93)</sup>

*Xanthomonas translucens* の carnitine dehydrogenase を精製した。本酵素は分子量 74,000 で、2個の等しいサブユニットから構成され、至適 pH 9.0 (正反応) および 6.5 (逆反応)、至適温度 45°C、*N*-末端アミノ酸は histidine であった。また、L-carnitine, NAD<sup>+</sup>, 3-dehydrocarnitine および NADH に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $1.0 \times 10^{-2}$  M,  $2.5 \times 10^{-4}$  M,  $1.71 \times 10^{-3}$  M および  $4.0 \times 10^{-5}$  M で、Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, *p*-CMB などによって強く阻害された。<sup>94)</sup>

Phenanthrene に生育した *Alcaligenes faecalis* AFK 2 から *cis*-phenanthrene dihydrodiol dehydrogenase を精製した。本酵素は分子量 100,000 で、4個の等しいサブユニットから構成され、至適 pH 9.0, 至適温度 40°C で、70°C で10分間熱処理や Co<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> などの金属あるいは EDTA, 2, 2-dipyridyl などのキレート剤で処理すると失活した。<sup>95)</sup>

*Pseudomonas* sp. TMY 1009 からリグニンモデル化合物の C $\alpha$ -位の2級アルコール基を酸化する2種の NAD 依存 C $\alpha$ -dehydrogenase (DH-I, II) を精製した。DH-II は分子量 125,000 で、4個の等しいサブ

ニットから構成され、DH-I は分子量94,000の単量体であった。両酵素は3種のリグニンモデル化合物に活性を示したが、その反応特性や親和性には差があった。<sup>96)</sup>

*Brevibacterium fuscum* DC33 の 7 $\alpha$ -hydroxysteroid (HS) に特異的に作用する dehydrogenase を精製した。本酵素は分子量104,000で、4個の等しいサブユニットから構成され、至適 pH 5.3 (還元反応) および 10.5 (酸化反応)、至適温度 25~30°C で、40°C で 30 min 処理すると失活した。なお、本菌からは同時に 3 $\alpha$ -HS 類および 12 $\alpha$ -HS 類にそれぞれ特異的に作用する dehydrogenase も精製した。<sup>97)</sup>

Pyrroloquinoline quinone (PQQ) を補酵素とする *Gluconobacter industrius* の膜結合型 glycerol dehydrogenase は EDTA 処理によってアポ酵素に変換した。このアポ酵素は Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> などの存在下に PQQ と結合してホロ酵素となり、酵素活性を発現した。<sup>98)</sup>

*Pseudomonas fluorescens* FM-1 から精製した D-gluconate dehydrogenase をカーボンペースト上に吸着固定した電極は D-gluconate を電解酸化した。この反応は固定化酵素自身が直接電極と電子移動を行った結果であり、酵素が複数の酸化還元サイトを有していることによるものと考えられた。<sup>99)</sup>

*Xanthobacter autotrophicus* の酸素耐性機構を調べた。酸素耐性株 Y38 とその親株である酸素感受性株 N34 との間で両株の hydrogenase (Hase) 活性に差は認められなかった。しかし、Y38 株は高濃度酸素存在下にも Hase を合成したのに対し、N34 株は空気存在下においても Hase を合成しなかった。一方、高濃度酸素存在下に生育した Y38 株には強い superoxide dismutase (SOD) 活性、catalase および ribulose biphosphate oxygenase 活性が認められ、これらの酵素が酸素耐性機構に関与するものと考えられた。<sup>100,101)</sup>

*Candida rugosa* IFO 0591 の nitrite 酸化活性を精製した。本活性は分子量220,000で4個の等しいサブユニットから構成され、277 nm, 405 nm に吸収極大を示し、この吸収極大は dithionite を添加しても変化しなかった。これらの結果などから本活性は catalase であり、nitrite 酸化は peroxidase 活性によるものと考えられた。<sup>102)</sup>

*Arthrobacter simplex* U-S-3011 の菌体外 cholesterol oxidase を精製した。本酵素は分子量57,000、至適 pH 7.5、至適温度 50°C、cholesterol に対する  $K_m$

値  $3.08 \times 10^{-5}$  M で、Triton X-100 によって活性が増大され、SH 試薬によって阻害された。<sup>103)</sup>

*Pseudomonas maltophilia* の nucleoside oxidase を精製した。本酵素は分子量130,000で、補欠分子族として鉄を含み、等電点 pH 5.3、至適 pH 6.0 で、nucleotide 類や ribose には作用せず、分子状酸素を利用して nucleoside 類を nucleoside-5'-aldehyde および nucleoside-5'-carboxylic acid に酸化した。<sup>104)</sup>

*Candida boidinii* S2 の alcohol oxidase を酵素-azide 複合体として高収率に精製した。本法は単純な手法であり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や aldehyde 類による酵素の不活化も軽減できた。<sup>105)</sup>

*Pseudomonas putida* ATCC 12633 から精製した aminobutyraldehyde dehydrogenase と新たに分離したグラム陽性細菌 B-6-3 株から精製した putrescine oxidase とを併用する putrescine の特異定量法を開発した。本法では 2 nmol の putrescine を感度良く正確に測定することができた。<sup>106)</sup>

*Chaetomium thermophile* O-453 の polyphenol oxidase を精製した。本酵素は分子量98,000で3個の等しいサブユニットから構成され、補欠分子族として銅を含み、*d*-catechin、*l*-epicatechin、guaiacol などに作用したが、phenol、*p*-quinone、resorcinol などには作用しなかった。なお、本活性は thiourea、cysteine、Na-azide などによって阻害され、Hg<sup>2+</sup> や Fe<sup>2+</sup> によって不活化されたが、CO によっては影響されなかった。<sup>109)</sup>

*Bacillus circulans* IFO 3329 の superoxide dismutase を精製した。本酵素は分子量46,000で、2個の等しいサブユニットから構成され、補欠分子族として Mn を含み、等電点 pH 5.2、安定 pH 5.0~8.0 であった。<sup>108)</sup>

## 7-9 糖代謝および TCA 関連酵素

好アルカリ性菌 *Bacillus* sp. OK-I の alkaline phosphatase を精製した。本酵素は分子量108,000で、2個の等しいサブユニットから構成され、至適 pH 11、安定 pH 5~12、*p*-nitrophenylphosphate に対する  $K_m$  値  $3.7 \times 10^{-5}$  M であった。なお、本活性は EDTA 処理によって失活し、Co<sup>2+</sup> 添加によって回復した。<sup>109)</sup>

*Zygosaccharomyces rouxii* の acid phosphatase (APase) を調べた。本菌の APase は *Saccharomyces cerevisiae* のそれとは基質特異性において違いが認められたが細胞内局在 (主にペリプラズマに存在) は共

通していた。また、*Z. rouxii* の耐塩性低下変異株の APase は親株のそれと全く同じで、酵母の耐塩性と APase 細胞表面透過性との間には関連性が認められなかった。<sup>110)</sup>

Polyphosphate kinase (PPKase) 活性を検索し、*Alcaligenes faecalis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* などの細菌類に見出した。これらの中の *E. coli* B から抽出した PPKase は逆反応をも触媒し、ADP と metaphosphate から ATP を生成し、この反応は PPKase 活性と glucose-6-phosphate を生成する hexokinase との共役反応であった。<sup>111)</sup>

パン酵母の  $\alpha$ -glucan phosphorylase ( $\alpha$ GPase) を調べた。本酵素の glucose-1-phosphate, glycogen および maltopentaose に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $1.3 \times 10^{-3}$  M,  $1.0 \times 10^{-4}$  M および  $8.8 \times 10^{-3}$  M で、これらの  $K_m$  値と maltopentaose に対する解離定数の比較から筋肉中の  $\alpha$ GPase との類似性が認められた。しかし、ジャガイモの  $\alpha$ GPase とは明瞭な違いが認められた。<sup>112)</sup>

*Pseudomonas putida* IFO 3738 の glyoxalase I 遺伝子の核酸配列を調べた。本遺伝子は 164 個のアミノ酸から成るペプチドをコードし、このペプチドの分子量は本酵素の分子量 (19,500) とほぼ同一であった。なお、本酵素の遺伝子を *Escherichia coli* に導入して発現させた酵素の N-末端アミノ酸は methionine から serine に代っていた。<sup>113)</sup>

*Pseudomonas* sp. OX-53 の oxalate oxidase を精製した。本酵素は分子量 320,000 で、8 個の等しいサブユニットから構成され、1 サブユニット当たり 1.12 原子のマンガンおよび 0.36 原子の亜鉛を含み、等電点 pH 4.7、安定 pH 5.8~7.0 で、oxalate ( $K_m$  値  $9.5 \times 10^{-3}$  M) 以外に glyoxylate や malate も酸化した。なお、本活性は flavin 類や phenylhydrazine などによって活性化され、 $I^-$ ,  $Br^-$ , semicarbazide, hydroxylamine によって阻害された。<sup>114)</sup>

## 7-10 抗生物質および生理活性物質関連酵素

*Malbranchea* の penicillin (P) acylase を調べた。本酵素は benzyl- および phenoxymethyl-P に対して活性を示し、至適 pH 8.0、至適温度 37°C であった。なお、本菌を乾燥して固定化しても約 90 日間活性を保持し、10 反復合計 40 日間の連続使用で 6-amino penicillanic acid の濃度は当初の約 12.5% に低下した。<sup>115)</sup>

*Flavobacterium saccharophilum* から validoxylamine A をその 3-keto 体に酸化する D-glucoside 3-dehydrogenase を精製した。本酵素は分子量 65,000 の単量体で、2, 6-dichlorophenolindophenol, phenazine methosulfate および cytochrome  $C_{551}$  を還元する反応の至適 pH はそれぞれ 6.0, 8.0~9.0 および 7.0 であった。<sup>116)</sup>

*Mucor javanicus* の glutathione transferase を精製した。本酵素は分子量 22,000 の 2 個の等しいサブユニットから構成され、glutathione および 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $4.8 \times 10^{-4}$  M および  $1.0 \times 10^{-3}$  M であった。なお、CDNB は本酵素の最適基質であったが、2, 3-, 2, 4- および 3, 4-dichlorobenzene にも作用し、その変換速度は CDNB に対するその 0.17~0.34% であった。<sup>117)</sup>

酵母の glutathione S-transferase を調べた。*Issatchenkia* 属および *Candida* 属の菌株に強い活性が認められ、これらは構成的であり、*o*-dinitrobenzene, L-cysteine, glycine などを添加すると増強された。なお、本活性は不安定で、硫酸塩析や溶液状態で 4°C に 2 週間放置するとほぼ失活したが、20% glycerol, 1 mM EDTA, 2 mM DTT および 10 mM NaHSO<sub>3</sub> を含む溶液中では安定であった。<sup>118)</sup>

*Eremothecium ashbyii* IFO 0944 の riboflavin synthase をアフィニティークロマトグラフィーで精製した。担体として 6-carboxyethyl-7-hydroxy-8-ribityl lumazine と結合させた AH-Sephadex 4B を用い、5 mM の 6, 7-dimethyl-8-ribityl lumazine を含む 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> で溶出すると酵素は 100 倍に精製された。<sup>119)</sup>

*Bacillus circulans* WL12 の溶菌酵素と表面活性剤 emulgen 120 を併用すると *Pyricularia oryzae* に対する polyoxin B および kitazin P の最少阻止濃度は低下した。*Glomerella cingulata* および *Alternaria kikuchiana* に対してはさらに novozyme 234 あるいは *Streptomyces* sp. の粗酵素を添加するとほぼ同程度の効果が認められた。<sup>120)</sup>

## 7-11 その他

Propionaldehyde から propion を生成する propion synthase を酵母から精製した。本酵素は分子量 100,000、至適 pH 6.8~7.0、至適温度 37°C であった。なお、本活性は Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, thiamine, pyrophosphate,  $\beta$ -mercaptoethanol などによ

て促進され、 $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  などによって阻害された。<sup>121)</sup>

*Fravobacterium* sp. の endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase を用いて鶏卵アルブミンとその糖鎖との開裂反応を調べた。本反応の至適 pH は 5.0,  $K_m$  値は  $2.67 \times 10^{-3} \text{ M}$  で、反応生成物による阻害は認められず、ovalbumin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> および A<sub>3</sub> のいずれにもほぼ同程度の活性を示した。<sup>122)</sup>

*Alcaligenes* sp. F-1906 の endo- $\alpha$ -*N*-acetylgalactosamidase を精製した。本酵素は分子量160,000, 至適 pH 4.5 で、asialofetuin および asialo  $\kappa$ -casein glycopeptide の serine または threonine 残基に  $\alpha$ -グリコシド結合している Gal  $\beta 1 \rightarrow 3$  GaNAc を遊離し、各基質に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $3.7 \times 10^{-3} \text{ M}$  および  $3.2 \times 10^{-3} \text{ M}$  であった。<sup>123)</sup>

*Pseudomonas* sp. 881 の endo- $\alpha$  1, 4-polygalactosamidase を精製した。本酵素は分子量31,000, 等電点 pH 6.7, 至適 pH 5.0, 至適温度 55°C であった。なお、本酵素は  $n \geq 4$  の oligogalactosamine 類に作用し、 $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , SDS などによって阻害された。<sup>124)</sup>

*Candida maltosa* ATCC 20184 の pyrocatechase を精製した。本酵素は分子量33,000のサブユニット2個から構成され、至適 pH 8.5, 至適温度 37°C, 安定 pH 8.0~9.0 で、catechol に作用して *cis*, *cis*-muconic acid を生成した。<sup>125)</sup>

糸状菌の  $\beta$ -xylosidase を調べた。*Aspergillus niger* の水解活性は供試菌の中では最も強力で、acetone や alcohol 類などの水溶液有機溶媒中でも安定であり、50%(v/v) acetone 中で34時間 (30°C) 後でも初期活性の50%を保持したが、50°C では不安定であった。なお、有機溶媒中での本酵素は水解活性よりもむしろ3転位活性を強く示した。<sup>126)</sup>

*Streptococcus mutans* の glucosyltransferase に対するメイラード反応生成物 ( $M_x$ ) の影響を調べた。等電点が pH 4.6 付近の鶏卵アルブミンや casein と glucose とから調製した高分子量  $M_x$  では本活性を阻害したが、等電点が pH 5.8~7.3 の免疫グロブリンと glucose とから調製した高分子量  $M_x$  では阻害が認められなかった。<sup>127)</sup>

*Aspergillus niger* ATCC 20611 の fructooligosaccharide (FOS) 類合成活性を調べた。本活性は  $\beta$ -fructofuranosidase と  $\beta$ -D-fructosyltransferase とからなり、後者の方が強力で、50%(w/v) sucrose を 1F(1-

$\beta$ -fructofuranosyl) $_n$ -sucrose ( $n=1\sim 3$ ) の inulin 型構造を含む FOS に変換した。<sup>128)</sup>

*Arthrobacter ilicis* OKU 178 の inulin fructotransferase を精製した。本酵素は分子量50,000で、2個の等しいサブユニットから構成され、至適 pH 5.5, 至適温度 60°C, 安定 pH 4.0~11.0 で、70°C (pH 7.0) で30分間熱処理しても安定であった。<sup>129)</sup>

*Bacillus circulans* C31 の cyclomaltodextrin glucanotransferase を精製した。本酵素は分子量103,000, 至適 pH 5.5, 至適温度 60°C, 安定 pH 5.5~9.0 で、5%可溶性デンプン溶液 (pH 7.0) を用いた場合、基質の28%を  $\beta$ -cyclodextrin に変換した。<sup>130)</sup>

*Bacillus subtilis* IFO 12113 の protopectinase を精製した。本酵素は分子量30,000, 等電点 pH 9.4 で、polygalacturonase 活性は全く示さず、温州ミカンの果皮から分子量約110,000の高分子 pectine を遊離した。<sup>131)</sup>

北米産螢 *Photinus pyralis* の尾部から調製した mRNA を鋳型として合成した cDNA をプラスミドに組み込み、これを *Escherichia coli* に導入し、luciferase cDNA をクローニングした。この cDNA に ATG 翻訳開始コドンをつけてから *Saccharomyces cerevisiae* のプラスミド PALf201 に導入したところ luciferase 活性が発現し、この活性は抗 luciferase 抗体によって完全に阻害された。<sup>132)</sup>

*Mycobacterium gastri* MB19 の 3-hexulose phosphate synthase を調べた。本酵素は ribulose 5-phosphate (R5P) と formaldehyde (FA), glycolaldehyde (GA) あるいは methylglyoxal (MG) との縮合反応を触媒し、R5P と GA との反応生成物の糖部分は heptulose であった。なお、FA, GA および MG に対する  $K_m$  値はそれぞれ  $1.4 \times 10^{-3} \text{ M}$ ,  $4.3 \times 10^{-3} \text{ M}$  および  $5.7 \times 10^{-3} \text{ M}$  であった。<sup>133)</sup>

担子菌 *Irpex lacteus* のレンネット様酵素 (MCA) から簡単な方法で proteinase (PA) を除去する方法を検討した。pH 6.5, 35°C で20分間処理することによって MCA 以外の PA などほぼ完全に失活し、MCA/PA 比は粗酵素標品の約1.8倍に上昇した。この値はアフィニティークロマトグラフィーで精製した値とほぼ同程度であった。<sup>134)</sup>

*Bacillus* sp. K-295G-7 の豆乳凝固酵素 I および II の酸化 insulin B 鎖に対する基質特異性を検討した。酵素 I は insulin B 鎖の Q(4)-H(5) など6ヶ所を切断し、酵素 II は E(13)-A(14) など3ヶ所を切断した。酵

素Ⅰの特異性は subtilisin のそれとよく似ていたが、酵素Ⅱの E(13)-A(14) の切断は特徴的であり、酵素Ⅰや subtilisin よりも比較的厳密であった。<sup>135)</sup>

*Flavobacterium* sp. I-16-04 の deoxyribonuclease を精製した。本酵素は分子量52,000, 至適 pH 8.5, 至適温度 20~40°C で、活性発現に  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  などの金属イオンを要求した。なお、本酵素の切断部位は  $CC^*\downarrow(A/T)GG$  で、 $C^*$  シトシンのメチル化によって切断は阻害された。<sup>136)</sup>

固定化酵素に関しては「単位操作・動力学」の項も参照されたい。

## 文 献

- 80) Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., Soda, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3099-3104 (1988).
- 81) Saito, H., Yamamoto, I., Ishimoto, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 377-385 (1988).
- 82) Koyama, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 735-741 (1988).
- 83) Tomita, K., Ito, M., Yano, T., Kumagai, H., Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1159-1163 (1988).
- 84) Iba, Y., Murata, K., Kimura, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2633-2634 (1988).
- 85) 上田誠之助, 大庭理一郎, 井尻須美子: 日食工誌, **35**, 302-308 (1988).
- 86) Sung, M.-H., Tanizawa, K., Masu, Y., Tanaka, H., Soda, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 269-270 (1988).
- 87) Nakayama, T., Esaki, N., Tanaka, H., Soda, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 177-183 (1988).
- 88) Asada, Y., Tanizawa, K., Soda, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2873-2878 (1988).
- 89) Yamada, K., Tani, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 711-719 (1988).
- 90) Yamada, K., Tani, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1951-1956 (1988).
- 91) Kise, S., Koizumi, N., Maeda, H.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 615-623 (1988).
- 92) Vongsuvanlert, V., Tani, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 419-426 (1988).
- 93) Shinagawa, E., Matsushita, K., Nakashima, K., Adachi, O., Ameyama, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2255-2263 (1988).
- 94) Mori, N., Kasugai, T., Kitamoto, Y., Ichikawa, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 249-250 (1988).
- 95) Nagao, K., Takizawa, N., Kiyohara, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2621-2623 (1988).
- 96) Habu, N., Samejima, M., Saburi, Y., Yoshimoto, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3073-3079 (1988).
- 97) Kinoshita, S., Kadota, K., Inoue, T., Sawada, H., Taguchi, H.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 145-152 (1988).
- 98) Adachi, O., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2081-2082 (1988).
- 99) Ikeda, T., Fushimi, F., Miki, K., Senda, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2655-2658 (1988).
- 100) 中村吉宏: 微工研報告, **69**, 15-20 (1988).
- 101) 中村吉宏: 微工研報告, **69**, 21-30 (1988).
- 102) Sakai, K., Takano, K., Tachiki, T., Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2783-2789 (1988).
- 103) Liu, W.-H., Meng, M.-H., Chen, K.-S.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 413-418 (1988).
- 104) Isono, Y., Hoshino, M., Sudo, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2135-2136 (1988).
- 105) Sakai, Y., Tani, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 227-233 (1988).
- 106) Shimizu, E., Tabata, Y., Hayakawa, R., Yorifuji, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2865-2871 (1988).
- 107) Ishigami, T., Hirose, Y., Yamada, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 401-407 (1988).
- 108) Lee, T. H., Lee, S. O.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1361-1367 (1988).
- 109) Nomoto, M., Ohsawa, M., Wang, H.-L., Chen, C.-C., Yeh, K.-W.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1643-1647 (1988).
- 110) Tanabe, H., H., Kamishima, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2629-2630 (1988).
- 111) Murata, K., Uchida, T., Kato, J., Chibata, I.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1471-1477 (1988).
- 112) Tanabe, S., Kobayashi, M., Matsuda, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 757-764 (1988).
- 113) Rhee, H.-I., Sato, N., Murata, K., Kimura, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2243-2246 (1988).
- 114) Koyama, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 743-748 (1988).
- 115) Singh, D., Goel, R., Johri, B. N.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**, 333-339 (1988).
- 116) Takeuchi, M., Asano, M., Kameda, Y., Matsui, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1905-1912 (1988).
- 117) Ando, K., Honma, M., Chiba, S., Tahara, S., Mizutani, J.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 135-139 (1988).
- 118) Kumagai, H., Tamaki, H., Koshino, Y., Suzuki, H., Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1377-1382 (1988).
- 119) 灘本知憲: 日農化, **62**, 1077-1079 (1988).
- 120) Watanabe, R., Ogasawara, N., Tanaka, H., Uchiyama, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 895-901 (1988).
- 121) Morimoto, S., Azuma, K., Oshima, T., Sakamoto, M.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 7-12

- (1988).
- 122) Kitabatake, N., Ishida, A., Yamamoto, K., Tochikura, T., Doi, E.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2511-2516 (1988).
- 123) Fan, J.-Q., Kadowaki, S., Yamamoto, K., Kumagai, H., Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1715-1723 (1988).
- 124) Tamura, J., Takagi, H., Kadowaki, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2475-2484 (1988).
- 125) Gomi, K., Horiguchi, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 585-587 (1988).
- 126) 篠山浩文, 安井恒男: 日農化, **62**, 1339-1343 (1988).
- 127) Kobayashi, S., Koga, K., Hayashida, O., Nakano, Y., Hasegawa, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3169-3171 (1988).
- 128) Hidaka, H., Hirayama, M., Sumi, N.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181-1187 (1988).
- 129) Kawamura, M., Takahashi, S., Uchiyama, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3209-3210 (1988).
- 130) Pongsawasdi, P., Yagisawa, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1099-1103 (1988).
- 131) Sakai, T., Ozaki, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1091-1093 (1988).
- 132) Tatsumi, H., Masuda, T., Nakano, E.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1123-1127 (1988).
- 133) Kato, N., Miyamoto, N., Shimao, M., Sakazawa, C.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2659-2661 (1988).
- 134) 菊地栄一, 小林秀行, 渋谷浩司, 日下部功, 村上和雄: 日食工, **35**, 48-51 (1988).
- 135) Kobayashi, H., Park, Y. W., Kaneda, M., Kusakabe, I., Yoshida, S., Murakami, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2351-2353 (1988).
- 136) Chiura, H., Noro, Y., Kanayama, S., Ueda, Y., Shimizu, U., Takagi, J.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2107-2109 (1988).

(7-7~7-11 農水省草地試験場 大桃定洋)

## 8. 菌 体 生 産

### Biomass Production

#### 8-1 いわし油に生育する酵母の分離

土壤中より, 長鎖高度不飽和脂肪酸に富んだ未精製いわし油を唯一の炭素源として増殖できる *Candida* 属酵母 FO-144C 株を得た. 生育最適温度は 28~30°C, 乾燥菌体収量は24時間後に 17.6 mg/ml, 最大増殖速度は 0.36 h<sup>-1</sup> であった. 菌体の粗脂肪は15.1%で, 菌体脂質の約半分がトリグリセリドであった. 脂肪酸組成はオレイン酸が最も多く, 長鎖高度不飽和酸は少なかった. 培地中には長鎖高度不飽和酸が濃縮された.<sup>1)</sup>

#### 8-2 メチオニン高含有メタノール酵母菌体の生産

メタノール酵母, *Candida boidinii* No. 2201 のエチオニン耐性変異株, E500-78 株を用い, メチオニン含有菌体生産性を向上させるための培養条件を検討した. 2%メタノール含有メチオニン生産培地で半回分培養したところ, 11日目で菌体内遊離メチオニン生産性は回分培養に比べ15倍増加し, 282 mg/l に達した. 連続培養で菌体内遊離メチオニン生産に関する最適条件を検討した結果, メタノール 0.8% (6.32 g/l), 希釈率 D=0.05 h<sup>-1</sup> で 10.16 mg/g-DCW の菌体内遊離メチオニンを蓄積し, メチオニン生産性は 1.14 mg/l/h

であった.<sup>2)</sup>

#### 8-3 エタノールからの菌体生産

土壤中より *Azotobacter* 属細菌 strain B を分離した. エタノール濃度 1% が本株の生育に最適であった. 生育の最適 pH は 7.0~7.5, 生育には Fe<sup>3+</sup> が不可欠であった. 海水に馴養することにより, 海水にも脱イオン水を用いて培養した場合と同様に良い生育を示した. ジャーフェーマンターにおける最適通気量は 0.5 vvm であった. 菌体のアミノ酸組成は, グルタミン酸の含量が他のアミノ酸に比べ多かった. 本株はフェニルピルビン酸よりフェニルアラニンを生成した.<sup>3)</sup>

#### 8-4 耐塩性乳酸菌の高速生産

汚過型培養槽を用いて培地中の食塩濃度を徐々に増加させる濃度勾配培養法により, 迅速に耐塩性乳酸菌 *Pediococcus halophilus* を生産することを検討した. 本法により“耐塩性”(18%の食塩を含む培地に植えかえた時に直ちに増殖できる能力)のある菌体が高濃度かつ迅速に得られた. 時間当たりの菌体生産性は18%食塩を含む培地を用いた回分培養の46~56倍であった. また, 物質生産条件と最適生育条件が異なる場合, 本