

[J. Ferment. Technol., Vol. 54, No. 5, p. 340~349, 1976]

 綜 説

醱酵法における L-イソロイシンの工業的 製造法に関する研究

昭和50年度日本醱酵工学会斎藤賞受賞

松 島 宏 親*

三共株式会社 醱酵研究所

Studies on the Microbial Production of L-Isoleucine

Hirochika Matsushima*

Fermentation Research Laboratories, Sankyo Co. Ltd., Tanashi, Tokyo

1. はじめに

L-イソロイシンは必須アミノ酸の一つであり、比較的高価である。天然蛋白質の加水分解により得られるが、他のアミノ酸とくにロイシンとの分離が困難であり、合成法によれば四種の異性体を生じるので、醱酵法による製法が有利といわれている。

イソロイシン醱酵において、普通の窒素過剰培地ではイソロイシンの蓄積は少なく、前駆物質を添加する方法が多く用いられている。しかし、薬剤耐性変異株を用いることにより、グルコースからのイソロイシンの生成^{1,2)}も報告されている。イソロイシン生合成は、(1) イソロイシンによる L-threonine dehydratase の feed back inhibition,³⁾ (2) バリンによる acetohydroxy acid synthetase inhibition,⁴⁾ (3) イソロイシン、バリン、ロイシンによるこれらの酵素生成に対する multivalent repression⁵⁾ 等により制御されており、イソロイシン醱酵の前駆物質として知られている化合物はかぎられている。

D-スレオニン,^{6~11)} DL- α -アミノ酪酸^{12~22)}を前駆物

質とする方法は、数多くの研究がなされている。著者らは、比較的容易に製造できる DL- α -ヒドロキシ酪酸を前駆物質としてイソロイシン生産菌のスクリーニングを行なった結果、すでに報告されている *Bacillus*, *Pseudomonas* 属²³⁾ 以外に、*Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Serratia* 属その他多くの属の細菌がイソロイシンの蓄積することを認めた。さらに、DL- α -ヒドロキシ酪酸よりも安価に製造できる DL- α -ブロム酪酸を原料として、L-イソロイシンを高収率で蓄積させることができた。本稿では、L-イソロイシンの工業的製造を目的として、生産菌のスクリーニング、培地条件、培養条件、醱酵液よりのアミノ酸回収と菌体分離、イソロイシン醱酵菌体の L-アスパラギン酸生産への再利用についての著者らの検討結果を中心に述べる。なお、同じ生産菌の静止菌体を用いる方法または培養法で、DL- α -ヒドロキシ、ブロム、ケトまたはチオケトカルボン酸から、対応する L-アミノ酸の生成にも成功した。^{24~30)}

2. L-イソロイシン生産菌のスクリーニング²⁴⁾

L-イソロイシン生産菌のスクリーニングに細菌 150 株を用いた。これらは、当研究所保存のものおよび東京大学応用微生物研究所、American Type Culture

* 現所属：エッセクス日本株、滋賀工場

Present address: Shiga Plant, Essex Nippon K. K. 1-4, Sasagaoka, Minakuchi-cho, Koga-gun, Shiga

Table 1. Screening of isoleucine-producing bacteria from DL- α -hydroxybutyric acid.

Strain	Isoleucine formed (g/l)
<i>Aerobacter cloacae</i> IAM 1221	1.8
<i>Bacillus roseus</i> IAM 1257	2.0
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> IAM 1641	4.0
<i>Corynebacterium equi</i> IAM 1038	1.0
<i>Escherichia coli</i> IAM 1239	0.4
<i>Flavobacterium sewanense</i> IAM 1014	0.3
<i>Micrococcus varians</i> IAM 1314	3.0
<i>Pseudomonas schuyllkilliensis</i> IAM 1178	0.4
<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	0.8
<i>Serratia marcescens</i> IAM 1106	1.2

Collection, Northern Utilization Research and Development Branch より分譲されたものである。

DL- α -ヒドロキシ酪酸を前駆物質としてスクリーニングした結果, *Bacillus*, *Pseudomonas* 属以外に *Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Serratia* 属その他多くの属の細菌がイソロイシンを蓄積した (Table 1)。

DL- α -ヒドロキシ酪酸は, 酪酸から DL- α -ブロム酪酸を経由して化学的に合成される。そこでより安価な DL- α -ブロム酪酸を用いてイソロイシン生産菌のスクリーニングを行なった結果, DL- α -ヒドロキシ酪酸と同

様の結果が得られた。DL- α -ヒドロキシ酪酸 2% または DL- α -ブロム酪酸 3.2% 含む培地に, *Brevibacterium ammoniagenes* IAM 1641 を培養して, イソロイシン 7~8 g/l 蓄積させることができた。

杉崎ら³¹⁾ は, グルタミン酸生産菌が, DL- α -アミノ酪酸から高収率でイソロイシンの生成することを報告している。そこで DL- α -ブロム酪酸を用いて, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* 属のグルタミン酸生産菌について試験を行った結果, 試験したすべての菌株がイソロイシンを高濃度に蓄積した (Table 2)。

3. 培地条件²⁵⁾

安価に製造できる DL- α -ブロム酪酸を原料とし, グルタミン酸生産菌 *Brevibacterium roseum* ATCC 13825 を用いる方法について以下の検討を行った。

DL- α -ブロム酪酸の含む培地を滅菌すると, DL- α -ブロム酪酸の分解により生じる酸のため, pH が著しく低下するので, この pH 低下を防ぐため, 培地に加える DL- α -ブロム酪酸をあらかじめ加水分解する方法を検討した (Fig. 1)。DL- α -ブロム酪酸の 16% 溶液 (pH 7 にアンモニア水で中和) を, 100°C 30 min 加熱処理することによりほとんど DL- α -ヒドロキシ酪酸に分解した。

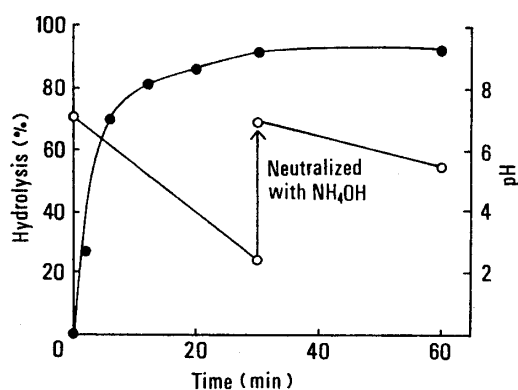
DL- α -ブロム酪酸中には原料の酪酸が含まれるが, 培地中の酪酸濃度が 1% になると, 菌の生育がわるくイソロイシン蓄積量が低下した。また, DL- α -ブロム酪酸

Table 2. Formation of isoleucine by glutamic acid-producing bacteria from DL- α -bromobutyric acid.

Strain	Isoleucine formed (g/l)
<i>Brevibacterium divaricatum</i> NRRL 2311	4.5
<i>divaricatum</i> NRRL 2312	5.1
<i>immariophilum</i> ATCC 14068	5.1
<i>saccharolyticum</i> ATCC 14066	9.0
<i>fluvum</i> ATCC 13826	5.4
<i>fluvum</i> ATCC 14067	9.5
<i>lactofermentum</i> ATCC 13869	8.5
<i>roseum</i> ATCC 13825	12.3
<i>Corynebacterium lilium</i> NRRL B2243	6.4
<i>callunae</i> NRRL B2244	8.0
<i>acetoacidophilum</i> ATCC 13870	5.0
<i>Micrococcus glutamicus</i> ATCC 13032	6.7
<i>glutamicus</i> ATCC 13058	6.2
<i>glutamicus</i> ATCC 13761	5.1

Table 3. Composition of culture media for isoleucine formation from DL- α -bromobutyric acid.

	C1	S1	G1	G2
Cane molasses (g/l)	100			
Sucrose		100		
Glucose			100	100
DL- α -Bromobutyric acid	32	32	32	32
Corn steep liquor	10	10	10	10
Cotton seed flour	5	5	5	5
Urea	8	9	9	9
K ₂ HPO ₄		1		
CaCl ₂ ·2H ₂ O				1
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.5	0.5	0.5
Biotin (μ g/ml)		30	30	30
Thiamine (μ g/ml)		500	500	500
pH	7.0	7.5	7.5	7.5

Fig. 1. Hydrolysis of DL- α -bromobutyrate by heat treatment (100°C).

—●—: Hydrolysis (%), —○—: pH

3.2%の培地でイソロイシンを高収率で蓄積したが、さらに高濃度の4.8%, 6.4%になると、菌の生育がわるくイソロイシンの蓄積量も少なかった。

天然物の有機窒素源として、corn steep liquor 1%, 綿実粕0.5%の添加が良好であったが、無添加の時は、接種量1%では菌の生育が遅れるが、接種量5%では悪影響は認められなかった。また、尿素濃度は培養中のpH経過と関連して重要であった。

廃糖蜜を炭素源とする培地について主に検討し、C1培地で (Table 3) イソロイシン 12~14 g/l 蓄積させることができた。しかし、廃糖蜜に由来する多量の不純物のため、イソロイシンの精製が困難であったので、グルコースまたはシュクロースを炭素源とする培地について検討した。シュクロースを炭素源とする培地で

Table 4. Effect of potassium phosphate concentration on isoleucine formation.

Concentration of K ₂ HPO ₄ (g/l)	Isoleucine formed (g/l)
0	15.1
0.1	14.3
0.3	13.0
1	10.2
2	9.6
3	8.4

は尿素濃度0.9%が良く、S1培地でイソロイシン 16.7 g/l 蓄積した。この培地のシュクロースをグルコースにおきかえた培地では培養中のpHが低く、イソロイシン蓄積量は少ないが、リン酸塩を除去すること (GI培地) によりpHが上昇し、イソロイシン蓄積量は増加し (Table 4), さらに CaCl₂·2H₂O 1 g/l 添加 (G2培地) によりイソロイシン 16.1 g/l 蓄積した。

4. 培養条件²⁶⁾

微生物は、継代移植により性質が変わり、生産能の低下する例が知られている。イソロイシン生産菌を凍結乾燥法、鉱油重層法、凍結法、継代培養法の四種の方法で保存し、その生産能をしらべた結果、差は認められなかったが、簡便で長期保存のできる凍結法で主に保存した。

前培養の条件により本培養の収率に影響があるので、

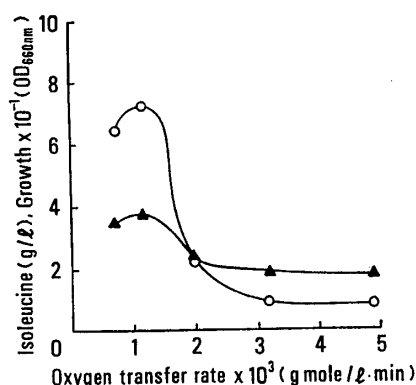


Fig. 2. The effect of oxygen transfer rate on isoleucine formation.

Brevibacterium ammoniagenes IAM 1641 was cultured in a 5 l jar fermenter.

—○—: Isoleucine, —▲—: Growth

前培養条件を、スケールアップを考慮して5lジャーフェーマンターで検討した。ブロム酪酸により菌が生育阻害を受けること、生育阻害が馴養によりかなり緩和されること等から、ブロム酪酸濃度を、種培養0%→前培養1.6%→本培養3.2%とした。前培養時間は、菌体量が最大生育時の1/3~1/2に達した時に適当であり、これをすぎると、菌の生育がわるく糖消費が少なくイソロイシン蓄積量も低い値であった。

醗酵タンクのスケールアップを行うため、まず亜硫酸ソーダ法により酸素移動速度を測定した。³²⁾ つぎにイソロイシン蓄積におよぼす酸素移動速度の影響を5lジャーフェーマンターでしらべ、 1.2×10^{-3} g mole/l·min 付近がイソロイシン蓄積に適していることを求めた (Fig. 2)。さらに、酸素移動速度一定で、通気量お

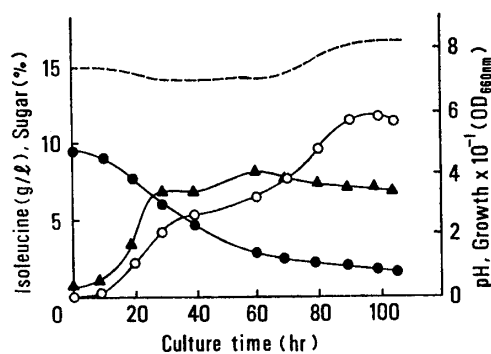


Fig. 3. Formation of isoleucine in a 600 l tank (Medium Cl).

—○—: Isoleucine, —●—: Sugar, —▲—: Growth, — — —: pH

よび攪拌数を変えても影響のないことをしらべた後に、酸素移動速度を基準として100lタンク、600lタンクに好収率でスケールアップすることに成功した (Fig. 3)。

なお、林部ら²⁰⁾は、*Bacillus subtilis*を用いるDL-α-アミノ酪酸よりのイソロイシン醗酵において、ジャーフェーマンターを用いて $kd=3 \sim 8 \times 10^{-6}$ (g mole/ml·min·atm) の範囲でイソロイシン生産が順調に行われることを報告している。

5. 醗酵液よりのアミノ酸回収と菌体分離²⁷⁾

イソロイシン醗酵液から菌体を分離して、イソロイシンを回収する方法について検討を行った。

まず汙過により菌体分離する方法を検討した。放線菌の場合は通常汙過が用いられるが、難汙過の場合が多く、醗酵液の酸性化、³³⁻³⁵⁾ 酸性加熱、³⁶⁾ 菌体の自己

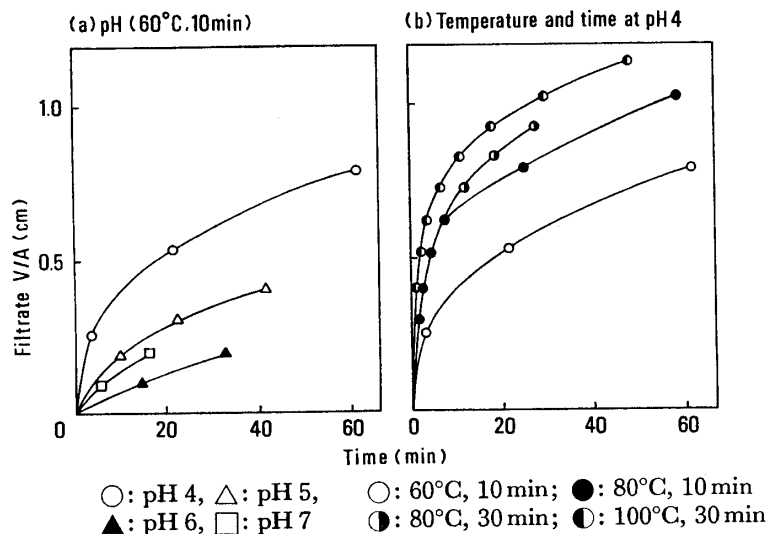


Fig. 4. Effect of heat treatment on filtration resistance.

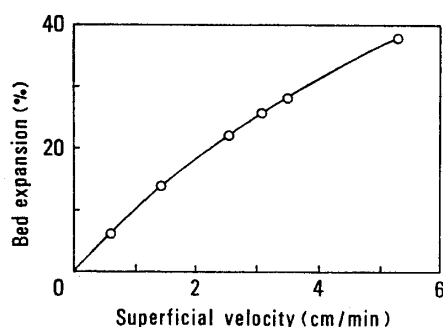


Fig. 5. Effect of superficial velocity on bed expansion of ion exchange resin (Dowex 50 WX8, 20~50 mesh).

消化³⁷⁾等の処理により汙過抵抗を小さくする方法が報告されている。醗酵液のpH調整、加熱処理等を行ったが汙過抵抗は大きく (Fig. 4), 凝集剤の併用, 汙過助剤の検討も行ったが著しくは良くならなかった。フィルタープレス, オリバーフィルター等の汙過機について試験を行なったが, 10%以上の珪藻土の添加が必要であり, 工業的菌体分離法として汙過は適当とは認められなかった。

醗酵液の汙過は困難であるので, 菌体を除去しないでイソロイシンを強酸性陽イオン交換樹脂塔に吸着させる方法について検討した。普通に用いられる下降法では, 菌体が樹脂の間につまり流速が著しく低下したが, 上昇法では安定した流速が得られた。流速2~2.4 cm/minの時に樹脂層が20%膨張し (Fig. 5), 流れの状態が良好であった。樹脂が流動することにより吸着能がやや低下したが, これはカラムを3個直列につなぐことにより防ぐことができた。なお, 菌体の存在によるイオン交換能の低下は, くりかえし使用しても認められなかった。さらに, 遠心分離機による菌体分離を検討した。円筒型遠心分離機は遠心効果が大きく, 確実に菌体を分離できたが, 固形分の自動排出ができず, 処理量も少ない。分離板型遠心分離機は, ノズル排出型のものが酵母の分離に広く用いられているが, 遠心効果が小さく微粒子の分離は困難である。それで, 分離板型遠心分離機の重液排出ノズルの面積を極めて小さくし, 給液速度を酵母の場合の10~20%に低下させることにより, 菌体を分離することができた (Table 5)。遠心分離機の処理量は, 遠心沈降面積に比例する³⁸⁾といわれているので, これをもとにスケールアップすれば良いと考えられる。

廃糖蜜を炭素源とする培地を用いた時は, 廃糖蜜に由来する不純物が多いので, イオン交換樹脂工程を省

Table 5. Centrifugation of culture broth by disk-bowl nozzle centrifuge.

Area of centrifugal sedimentation	28,000 m ²
Culture broth (pH 4)	
feed rate	229 l/hr
cell	27%
temperature	70°C
Operation time	7.6 min
Light liquid vol	19 l
cell	0%
Heavy liquid vol	10 l
cell	80%

略すると, イソロイシンの回収は極めて困難であった。したがって, 菌体分離しないで上昇法でイオン交換樹脂塔にイソロイシンを吸着させる方法が, 工程を短縮できるので優れている。グルコースまたはシュクロースを炭素源とする培地を用いた時は, イオン交換樹脂を用いることなく, 親水溶媒中で等電点沈澱を行うことによりイソロイシンの精製が可能であった。醗酵液中には多量の陽イオン (NH₄⁺) が含まれるので樹脂量が多くなり, 樹脂工程の省略が望ましい。したがって遠心分離が適当である。また, 分離菌体を利用してL-アスパラギン酸を生産する場合, 醗酵液の加熱処理や醗酵液を直接イオン交換樹脂塔へ流すことは, aspartase を失活させるので, 遠心分離により菌体分離することが必要である。

6. イソロイシン 醗酵菌体の L-アスパラギン酸生産への再利用²⁸⁾

Quastel, Woolf³⁹⁾ が, 1926年に大腸菌によるアスパラギン酸⇌フマル酸+アンモニアの反応を証明して以来, aspartase は TCA cycle でのアミノ酸生成に関与する重要な酵素であり, 広く微生物界に存在することが知られている。

微生物の aspartase を利用してフマル酸からL-アスパラギン酸を製造する方法として, フマル酸含有培地で培養する方法,^{40~42)} 静止菌体を用いる方法,^{43~45)} 固定化酵素を用いる方法,⁴⁶⁾ 固定化微生物を用いる方法^{47,48)} が報告されている。また, マレイン酸からL-アスパラギン酸を生成する方法,^{49~53)} グルコースを原料とするフマル酸醗酵に aspartase 活性の強い細菌を組み合わせる培養方法^{54,55)} も報告されてい

Table 6. Preparation of sodium aspartate.

Dissolution of* aspartic acid		MeOH added to aspartic acid solution (ml)	Sodium aspartate yield (mole) (%)
Water (ml)	Aspartic acid (g)		
10	10	30	90
5	10	30	97
2.5	10	30	97

* Equal molar amount of sodium hydroxide to aspartic acid was added.

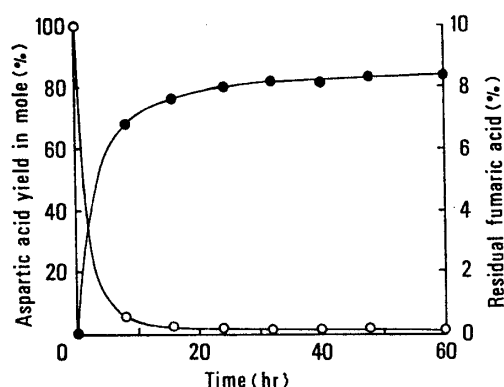


Fig. 6. Time course of aspartic acid formation.

—●—: Aspartic acid yield,
—○—: Residual fumaric acid

る。

イソロイシン醗酵菌体が、強い aspartase 活性の有することを発見し、この菌体を再利用してフマル酸から L-アスパラギン酸の製造する方法を検討した。

反応条件として、フマル酸の1/4量の菌体(乾燥菌体として)、菌体の4%のカチオン界面活性剤が必要であった。反応温度は45°Cが良く、pHは7~8の時に高い収率が得られた。5lジャーフェーマンターを用いて行ったアスパラギン酸生成の反応経過を Fig. 6 に示す。

アスパラギン酸の溶解度は極めて低いので、等電点沈澱法が有利な精製法である。反応液から不溶物を除去後濃縮し、等電点にすることにより結晶化させた。

アスパラギン酸ソーダの含水メタノールに対する溶解度は、メタノール濃度が高くなると急激に低下する。そこで、アスパラギン酸ソーダの水溶液にメタノールを添加して結晶化させる方法について検討し、アスパラギン酸から97%のモル収率でアスパラギン酸ソーダを得た (Table 6)。

以上の結果をもとに、イソロイシン、アスパラギン酸、アスパラギン酸ソーダの中間試製を行った (Fig.

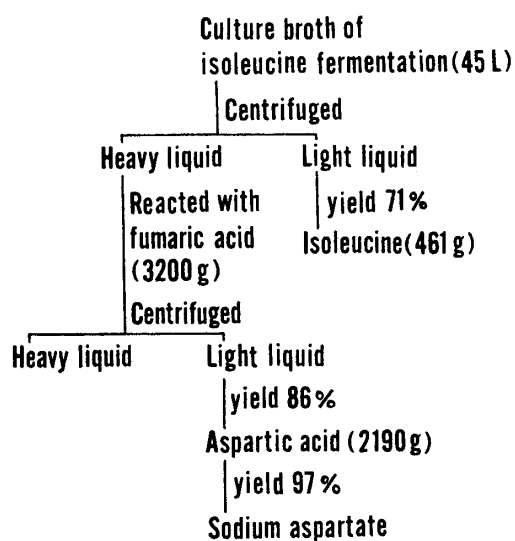


Fig. 7. Production of isoleucine, aspartic acid and sodium aspartate.

* Passed Japanese standards for food additives

** Passed Japanese industrial standards for guaranteed reagents

7). 100l タンクで、培地 G2 を用いて 72hr 培養してイソロイシンを蓄積させ、上澄液から食品添加物規格⁵⁶⁾に適品のイソロイシンを収率71%で得た。遠心分離した菌体をフマル酸と反応させ、収率84%でアスパラギン酸が生成し、この上澄液から回収率86%で JIS 試薬特級に適品の L-アスパラギン酸結晶を得た。

7. その他の L-アミノ酸の生産^{29,30)}

DL- α -ヒドロキシ酪酸を含む培地に細菌を培養して L-イソロイシン生産菌のスクリーニングを行った時に、多くの属の細菌が、L-イソロイシン以外に L- α -アミノ酪酸の蓄積することを認めた (Table 7)。DL- α -アミノ酪酸から L-イソロイシンへの生合成は α -ケト酪酸を経由する¹⁶⁾が、DL- α -ヒドロキシ酪酸から L-イソロイシンへの生合成も α -ケト酸を経由する⁵⁷⁾ので、

Table 7. Formation of L- α -aminobutyric acid from DL- α -hydroxybutyric acid.

Strain	α -Aminobutyric acid formed (g/l)
<i>Aerobacter aerogenes</i> IAM 1063	1.5
<i>Bacillus polymyxa</i> IAM 1210	1.0
<i>Corynebacterium equi</i> IAM 1038	0.8
<i>Escherichia coli</i> IAM 1239	0.4
<i>Flavobacterium rhenanum</i> B16-3	0.3
<i>Micrococcus luteus</i> IAM 1097	1.0
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3045	0.5
<i>Pseudomonas cruciviae</i> IAM 1048	2.0
<i>Sarcina marginata</i> IAM 1130	1.0
<i>Staphylococcus aureus</i> IAM 1058	0.3

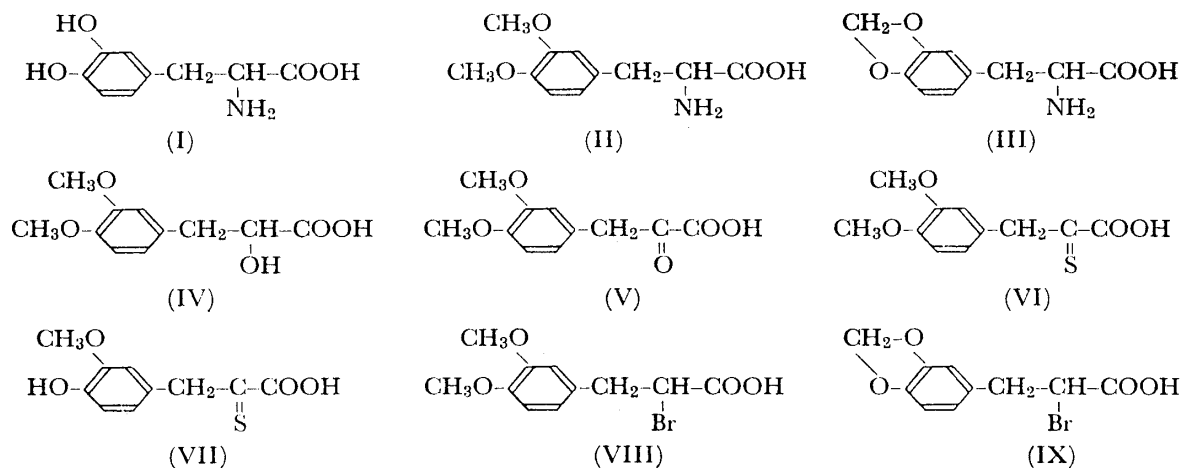
L- α -アミノ酪酸は α -ケト酸を経て生成するものと推定される。このような L- α -アミノ酪酸の生成法は、DL- α -ヒドロキシカルボン酸が対応する L- α -アミノ酸に変換したことになり、さらに一般的なアミノ酸生成法として適用できるかどうかを検討した。その結果、ロイシン、バリン、フェニルアラニン等が対応する DL- α -ヒドロキシカルボン酸から生成した。また、この反応をア

ミノ基供与体(グルタミン酸ソーダ)存在下で、細菌の静止菌体により酵素的に行うことができた (Table 8)。

なお、著者らの研究とは異なった菌株を使用し、和田^{58,59)}が、L-メチオニン、L-フェニルアラニン等のアミノ酸がヒドロキシカルボン酸から生成することを報告している。

最近、L-Dopa (I) がパーキンソン病の治療薬として多く使用され、⁶⁰⁾ 微生物を用いて L-Dopa を生産する試みがなされている。L-Tyrosine から酵素的にあるいは培養法で、^{61~68)} N-formyl-L-tyrosine から、⁶⁹⁾ 細菌の tyrosine phenol lyase を用いて pyrocatechol から^{70~78)} L-Dopa の生成が報告されている。

L-Dopa 合成の中間体 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-L-alanine (II) および 3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-L-alanine (III) を生産するため、L-アミノ酸を生産する方法を検討し、DL- α -ヒドロキシ (IV), ケト (V), チオケト (VI, VII) およびブロム (VIII, IX) カルボン酸を、細菌、かび、放線菌あるいは酵母の静止菌体を用いる方法または培養法で、それぞれ対応する L- α -アミノ酸へ変換することに成功した。もっとも生産能のすぐれていた *Brevibacterium roseum* による結果を Table 9 に示す。 α -ケトカルボン酸からの反応条件として、pH

Table 8. Formation of amino acids from DL- α -hydroxycarboxylic acids by cells of *Brevibacterium roseum* ATCC 13825.

DL- α -Hydroxycarboxylic acid	Amino acid formed	
DL- α -Hydroxyisovaleric acid 8 g/l	Valine	6.7 g/l
DL- α -Hydroxyisocaproic acid 8	Leucine	6.0
DL- β -Phenyllactic acid 20	Phenylalanine	8.7

Monosodium glutamate was added double the weight of the DL- α -hydroxycarboxylic acid.

Table 9. Formation of L-Dopa intermediates from various substrates by cells of *Brevibacterium roseum* ATCC 13825.

Substrate	L-Dopa intermediate formed (g/l)
IV	3~4*
V	4~5*
VI	0~0.5*
VII	0**
VIII	1~2*
IX	1~2***

* 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-alanine

** 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-alanine

*** 3-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-alanine

Table 10. Time course of 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-L-alanine formation from 3,4-dimethoxyphenyl-pyruvic acid by cells of *Brevibacterium roseum* ATCC 13825.

Time (hr)	3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-L-alanine formed (g/l)
0	2.6
24	7.0
48	8.3
72	10.6

7~8, 30°C が良く, 72hr で L-アミノ酸 10.6g/l 蓄積した (Table 10). ヒドロキシカルボン酸を用いた時, 反応液から α -ケトカルボン酸を単離したので, L-アミノ酸への変換に中間体として α -ケトカルボン酸を経由しているものと考えられる.

なお, Nagasaki ら⁷⁹⁻⁸¹⁾ はトランスアミナーゼにより 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-L-alanine の得たことを報告している.

8. お わ り に

L-イソロイシンを醗酵により生産するため, 筆者らが, 菌株のスクリーニングから工場生産のための培養および精製条件について, とくに収率の up, 現場化という面から検討した結果を中心に述べた. イソロイシン醗酵は, その代謝調節の点から数多くの研究がなされ, すぐれた総説⁸²⁻⁸⁴⁾ が書かれているので参照されたい.

文 献

- 1) Kisumi, M., Komatsubara, S., Sugiura, M., Chibata, I.: *J. Bacteriol.*, **110**, 761 (1972).
- 2) Shiio, I., Sasaki, A., Nakamori, S., Sano, K.: *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2053 (1973).
- 3) Umbarger, H. E., Brown, B. B.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 415 (1958).
- 4) Umbarger, H. E., Brown, B. B.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 1156 (1958).
- 5) Freudlich, M., Burns, R. O., Umbarger, H. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1804 (1962).
- 6) Kisumi, M.: *J. Biochem.*, **52**, 390 (1962).
- 7) Kisumi, M., Ashikaga, Y., Kato, J., Chibata, I.: *J. Biochem.*, **52**, 400 (1962).
- 8) Kisumi, M., Kato, J., Chibata, I.: *J. Biochem.*, **56**, 450 (1964).
- 9) Kisumi, M., Kato, J., Komatsubara, S., Chibata, I.: *Appl. Microbiol.*, **21**, 569 (1970).
- 10) Kisumi, M., Komatsubara, S., Chibata, I.: *J. Bacteriol.* **72**, 1065 (1972).
- 11) 志田, 藤井, 植村: *Amino Acids* 発酵と代謝, **7**, 16 (1963).
- 12) Chibata, I., Kisumi, M., Ashikaga, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **2**, 361 (1960).
- 13) 林, 渡辺, 藤井, 志村: *Amino Acids* 発酵と代謝, **1**, 89 (1959).
- 14) 志村, 斎藤: *Amino Acids* 発酵と代謝, **2**, 97 (1960).
- 15) 林部, 伊藤, 渡辺, 植村: *Amino Acids* 発酵と代謝, **2**, 100 (1960).
- 16) 志村, 斎藤: *Amino Acids* 発酵と代謝, **3**, 101 (1961).
- 17) 林部, 植村: *Amino Acids* 発酵と代謝, **3**, 108 (1961).
- 18) Hayashibe, M., Uemura, T.: *Nature*, **191**, 1417 (1960).
- 19) Hayashibe, M., Watanabe, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 82 (1962).
- 20) 林部, 杉橋, 佐伯, 荒川: *農化*, **36**, 437 (1962).
- 21) Nara, T., Samejima, H., Kinoshita, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 120 (1964).
- 22) 大和田, 大島, 神田, 浅野: *Amino Acid & Nucleic Acid* 発酵と代謝, **13**, 70 (1966).
- 23) 和田: 特許公報昭40-11918.

- 24) 松島, 間瀬: 醸工, **51**, 443 (1973).
- 25) 松島, 村田, 間瀬: 醸工, **51**, 775 (1973).
- 26) 松島, 村田, 間瀬: 醸工, **52**, 20 (1974).
- 27) 松島, 間瀬: 醸工, **52**, 423 (1974).
- 28) 松島, 村田, 間瀬: 醸工, **52**, 431 (1974).
- 29) 松島, 村田, 間瀬: 醸工, **53**, 443 (1975).
- 30) 松島, 村田, 間瀬: 醸工, **53**, 450 (1975).
- 31) 杉崎, 山本: 日本醸酵工学会大会講演要旨集, p. 45 (1965).
- 32) 松島, 前田, 笠原, 間瀬: 醸工, **50**, 105 (1972).
- 33) 一柳, 伊藤, 国枝, 高木, 織田: 醸工, **50**, 794 (1972).
- 34) 松島, 間瀬: 醸工, **54**, 36 (1976).
- 35) 松島, 間瀬: 醸工, **54**, 42 (1976).
- 36) 白土, 江角: 醸工, **41**, 86 (1963).
- 37) 白土, 鈴木, 江角: 醸工, **43**, 501 (1965).
- 38) 大山: 新化学工学講座, V-3, 20, 日刊工業新聞社 (1958).
- 39) Quastel, J. H., Woolf, B.: *Biochem. J.*, **20**, 544 (1926).
- 40) Kisumi, M., Ashikaga, Y., Chibata, I.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 196 (1960).
- 41) 木下, 中山, 北田: 醸協, **16**, 517 (1958).
- 42) 渡辺, 大沢, 信国: 農化, **38**, 434 (1964).
- 43) 北原, 福井, 三沢: 農化, **34**, 44 (1960).
- 44) 大和田, 垣沼, 金丸, 鈴木: 武田研究所年報, **25**, 32 (1966).
- 45) 高橋, 日野, 奥村, 三浦, 石田: *Amino Acids* 発酵と代謝, **7**, 23 (1963).
- 46) Tossa, T., Sato, T., Mori, T., Matsuo, Y., Chibata, I.: *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 69 (1973).
- 47) Chibata, I., Tossa, T., Sato, T.: *Appl. Microbiol.*, **27**, 878 (1964).
- 48) Tossa, T., Sato, T., Mori, T., Chibata, I.: *Appl. Microbiol.*, **27**, 886 (1974).
- 49) Takamura, Y., Kitamura, I., Iikura, M., Kono, K., Ozaki, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 338 (1966).
- 50) Takamura, Y., Kitamura, I., Iikura, M., Kono, K., Ozaki, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 345 (1966).
- 51) Takamura, Y., Soejima, M., Aoyama, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 207 (1967).
- 52) Takamura, Y., Takamura, T., Soejima, M., Uemura, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 718 (1969).
- 53) Takamura, Y., Ozawa, H., Soejima, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1501 (1970).
- 54) 高尾, 堀田: 醸工, **50**, 751 (1972).
- 55) 堀田, 高尾: 醸工, **51**, 12 (1973).
- 56) 日本食品添加物公定書, 日本衛生協会 (1968).
- 57) 和田: 農化, **48**, 359 (1974).
- 58) 和田: 農化, **48**, 297 (1974).
- 59) 和田: 農化, **48**, 351 (1974).
- 60) Cotzias, G. C., Papavasiliou, P. S., Gellene, R.: *New Engl. J. Med.*, **280**, 337 (1969).
- 61) Sih, C. J., Foss, P., Rossaza, J., Lemberger, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 6204 (1969).
- 62) Amao, S., Nii, M., Kobayashi, T., Hoshi, K., Ishibashi, K.: *Ann. Sankyo Res. Lab.*, **23**, 249 (1971).
- 63) Haneda, K., Watanabe, S., Takeda, I.: *Appl. Microbiol.*, **22**, 721 (1971).
- 64) Larway, P., Evans, W. C.: *Biochem. J.*, **85**, 22 (1962).
- 65) Yoshida, H., Tanaka, Y., Nakayama, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2121 (1973).
- 66) Yoshida, H., Tanaka, Y., Nakayama, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 455 (1974).
- 67) Yoshida, H., Tanaka, Y., Nakayama, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 627 (1974).
- 68) Tanaka, Y., Yoshida, H., Nakayama, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 633 (1974).
- 69) Singh, D. V., Mukherjee, P. P., Pal, S. P., Bhattacharyya, P. K.: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 713 (1973).
- 70) Enei, H., Matsui, H., Okumura, S., Yamada, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1869 (1972).
- 71) Enei, H., Matsui, H., Yamashita, K., Okumura, S., Yamada, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1861 (1972).
- 72) Kumagai, H., Kashima, N., Torii, H., Yamada, H., Enei, H., Okumura, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 472 (1972).
- 73) Enei, H., Matsui, H., Nakazawa, H., Okumura, S., Yamada, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 493 (1973).
- 74) Enei, H., Yamashita, K., Okumura, S., Yamada, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 485 (1973).
- 75) Enei, H., Nakazawa, H., Okumura, S., Yamada, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 725 (1973).

- 76) Kumagai, H., Yamada, H., Matsui, H., Ohkishi, H., Ogata, K.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1767 (1970).
77) Kumagai, H., Yamada, H., Matsui, H., Ohkishi, H., Ogata, K.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1773 (1970).
78) Kumagai, H., Kashima, N., Yamada, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 796 (1970).
79) Nagasaki, T., Sugita, M., Fukawa, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 587 (1973).
80) Nagasaki, T., Sugita, M., Fukawa, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2841 (1973).
81) Nagasaki, T., Sugita, M., Fukawa, H., Lin, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 363 (1975).
82) 林部: 蛋白質核酸酵素, **7**, 12 (1962).
83) 大石, 植村: 蛋白質核酸酵素, **10**, 117 (1965).
84) 木住, 小松原, 千畑: 蛋白質核酸酵素, **18**, 65 (1973).

(昭51. 3. 6受付)