—受賞論文—

Applications of *Streptomyces* Enzymes in Food Industry*

放線菌糖質関連酵素の食品分野への展開*

白坂直輝¹, 原園幸一^{1, **}, 中東良太¹, 大沼貴之²

(しらさか なおき, はらぞの こういち, なかひがし りょうた, おおぬま たかゆき)

Naoki Shirasaka,¹ Koichi Harazono,^{1, **} Ryota Nakahigashi,¹ and Takayuki Ohnuma²¹ ナガセケムテックス株式会社

620-0853 京都府福知山市長田野町 1-52

² 近畿大学農学部バイオサイエンス学科

631-8505 奈良市中町 3327-204

¹ Nagase ChemteX Corporation

1-52 Osadanochi, Fukuchiyama, Kyoto 620-0853, Japan

² Department of Advanced Bioscience, Kindai University

3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

要旨: 放線菌は古くから食品用酵素の生産株として広く使われている。我々は安全性の高さと遺伝子資源の豊富さから、*Streptomyces* 属細菌を有望な酵素生産株の一つとして取り上げ、技術開発に注力してきた。食品用酵素の生産で実績を持つ宿主株と、自然界で起こりうる遺伝子交換(ナチュラルオカレンス)に該当する現象を利用して生産株を構築し、顧客のあらゆるニーズに対応し、高純度かつ高効率で酵素を生産することができる技術確立した。本技術を利用して、様々な放線菌由来糖質関連酵素の研究成果を報告している。また、並行して酵素大量生産のための培養技術や酵素精製技術を研鑽し、*Streptomyces* 属由来のグルカナーゼとキチナーゼの工業生産に成功した。グルカナーゼやキチナーゼはそれぞれ酵母エキス製造や食品素材製造に利用されている。さらに、食品分野への新たな展開として、食品の日持ち向上や食品ロス低減への貢献を期待している。

キーワード: 放線菌, グルカナーゼ, キチナーゼ, 食品酵素, 抗菌活性***

1. はじめに

放線菌 (order *Actinomycetales*) は、細菌の一分類群であるグラム陽性細菌に属している。複雑な形態分化と、有用かつ多様な化合物生産という二つの大きな特徴を持っている細菌群である¹⁾。放線菌である *Streptomyces* 属細菌は豊富な二次代謝系を有し、Streptomycin に代表されるような抗生物質を生産する菌が多く、それらは医薬、農薬、動物薬として既に実用化されている。放線菌は特定の遺伝子(16S rRNA gene)の塩基配列の類似性によって定義されるようになったが、GC含量が高いという化学分類学的特徴を持っている。ゲノムサイズが最も大きな原核生物であり、遺伝子数は真核生物と同等以上である。ゲノムには遺伝子パラログが多く、豊富な二次代謝系やユニークな遺伝子を持ち、酵素の宝庫ともいうことができる。これまでにさまざまな放線菌のゲノム遺伝子配列が公開されており、実に多様な酵素遺伝子を持っていることが分かる²⁾。自然界で「分解者」として機能していることを裏付けるように、動植物や微生物等の細胞壁を分解する酵素遺伝子が多数存

在している。

古くから食品用酵素生産菌として放線菌が使われており、放線菌由来の酵素製剤として、グルコースイソメラーゼ (GI, EC 5.3.1.5)³⁾とトランスグルタミナーゼ (TG, EC 2.3.2.13)⁴⁾がよく知られている。GIは、グルコースをフルクトースに変換する酵素で、異性化糖(ぶどう糖果糖液糖)の製造に使われている。異性化糖は、フルクトースの性状に基づき、さわやかな甘味を示し、清涼飲料水や加工食品等に幅広く使われている。TGは、タンパク質に作用する酵素であり、タンパク含有食品のテクチャーの改質に使用されている。

我々は、食品用途向け酵素生産株としての安全性の高さ、遺伝子資源の豊富さから、放線菌を酵素生産菌の1つとして技術開発に注力している。現在では食品用途で使われた実績を持つ宿主を使用し、自然界で起こりえる場合(ナチュラルオカレンス)に該当する生産株を構築する技術により、顧客のあらゆるニーズに対応して、高純度、高効率で酵素を生産することができるようになっている。これまで、リン脂質を加水分解する各種ホスホリパーゼ

* 本原稿は、日本応用糖質科学会令和元年度大会の技術開発賞受賞講演で一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 0773-27-4371, Fax. 0773-27-6450, E-mail: koichi.harazono@ncx.nagase.co.jp)

*** Key words: *Streptomyces*, glucanase, chitinase, food enzyme, antifungal activity

(EC 3.1.1.4, EC 3.1.4.4) や各種ペプチダーゼ (EC 3.4.1.-) を製品化してきた⁹⁾。本稿では、放線菌発現技術を利用して生産され、機能解明や工業生産に成功した放線菌由来糖質関連酵素の食品分野への展開について述べる。

2. 放線菌酵素発現技術

ナガセケムテックス株式会社が保有する放線菌の高発現システムは、安全な宿主である *Streptomyces violaceoruber* と強力なプロモーターとターミネーターの組み合わせで構成されている。*Streptomyces* 属細菌のベクターとして、pIJ101 や pSG5, SCP2 といった複数のプラスミドが知られているが、改良された様々な派生ベクターも構築されている⁶⁾。pIJ101 派生ベクターは高コピー数のプラスミドになることが知られており、宿主中で安定に保持されることから多くの研究で使用されている⁷⁾。本発現システムでは、有用な酵素遺伝子が強力なプロモーターの制御下に組み込まれた高発現ベクターを宿主に導入して、酵素を大量生産している。強力なプロモーターとしては、メタロエンドペプチダーゼ遺伝子⁸⁾やホスホリパーゼ D 遺伝子⁹⁾上流域等の塩基配列を使用している。

一般的に、16SrRNA 塩基配列の相溶性が高い微生物は系統分類学上近縁であるとされている。また、*Streptomyces* 属細菌の多くが自然界において、菌と菌との接合による遺伝子交換を行うことが報告されている¹⁰⁾。16S rRNA 情報を元に得られた系統樹と、芳香族ポリケチド生合成に関わる遺伝子の情報を元に得られた系統樹を比較すると、相溶性の高い芳香族ポリケチド生合成に関わる遺伝子を持つ微生物群が、分類学上近縁ではない *Streptomyces* 属に存在することがあり、それは *Streptomyces* 属間で広く遺伝子が交換されていることを示す証拠と考えられている¹¹⁾。以上のことから、遺伝学的、実験的及び系統学的な根拠により、自然界において *Streptomyces* 属間で遺伝子交換がなされているものと科学的に考えられ、「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合 (いわゆるナチュラルオカレンス)」に該当すると判断されている¹²⁾。

弊社は放線菌のゲノムデータベースから酵素遺伝子を抽出し、本放線菌発現技術を用いて酵素生産株を構築し、数

百種類に及ぶ酵素の生産に成功しており、放線菌酵素ライブラリーとして保管している。本酵素ライブラリーは、糖質、蛋白質、脂質の改質・分解に関わる酵素に分類できる。弊社では、この放線菌ライブラリーを産官学の研究・開発者の方々に評価いただき、市場に新しい酵素を提案し続けていきたいと考えている。

放線菌は澱粉やセルロース、ヘミセルロースといった多糖類の加水分解酵素遺伝子も保持している¹³⁾。放線菌酵素ライブラリー中の糖質関連酵素について、表1に示す。共同開発にて発見した新しい糖質関連酵素の事例について、以下にいくつか紹介したい。

3. グルカナーゼ

ナガセケムテックス株式会社では酵母エキス製造用として、グルカナーゼ製剤を2011年から販売している。本製品は弊社が得意とする放線菌 (*Streptomyces*) の技術を駆使して開発されたものである。本酵素と同じ GH64 に属する *Streptomyces* 属由来の β -1,3-グルカナーゼ (EC 3.2.1.39) については、その結晶構造解析も報告されている¹⁴⁾。 β -1,3-グルカンはらせん状の立体構造を取ることが知られており¹⁵⁾、本酵素の基質結合部位におけるラミナリオリゴ糖との結合解析や、反応速度論解析により、酵素反応に寄与するアミノ酸の機能解析が行われている¹⁶⁾。グルカナーゼとは、グルコースで構成される多糖であるグルカンを加水分解し、オリゴ糖やグルコースを生成する酵素の総称であるが、食品添加物の定義としては各種微生物の培養物から得られた β -D-グルカンを加水分解する酵素である。グルカナーゼ活性試験法としては、カードランや β -グルカン (大麦由来)、もしくは乾燥酵母を基質として酵素反応を行い、還元糖の生成や重合度低下を検出することにより、加水分解を確認する方法が挙げられている¹⁷⁾。 β -1,4-グルカンであるセルロースを加水分解する酵素はセルラーゼ (EC 3.2.1.4) として定義されているため、グルカナーゼは β -1,3-グルカン、 β -1,3-(1,4)-グルカン、 β -1,3-(1,6)-グルカンといった、セルロース以外の β グルカンに作用する酵素を指す場合が多い。放線菌は GH16, GH55, GH64 といった β -1,3-グルカンに作用すると推測される遺伝子群を複数保持している。我々は複数の酵素遺伝子を放線菌発現系で

表1. 放線菌発現技術で構築した糖質関連酵素ライブラリー

GH/GT ファミリー	酵素反応	酵素名
GH13, GH15, GH31, GH77	澱粉・グリコーゲン分解	アミラーゼ α -アミラーゼ
GH18, GH19, GH20, GH46	キチン分解	キチナーゼ N-アセチル- β -ヘキソサミニナーゼ キトサナーゼ
GH25	細菌細胞壁分解	ムラミダーゼ
GH1, GH2, GH3, GH5, GH6, GH9, GH10, GH11, GH12, GH16, GH27, GH36, GH43, GH48, GH51, GH55, GH62, GH64, GH74, GH92	セルロース・ヘミセルロース分解	グルカナーゼ ヘミセルラーゼ グルコシダーゼ
GH18, GH85	蛋白質糖鎖分解	エンドグリコシダーゼ α -マンノシダーゼ
GT1, GT35, GT65	転移・合成	グルコシルトランスフェラーゼ

図1. グルカナーゼ処理前後の酵母の電子顕微鏡図

図2. キトオリゴ糖 (GlcNAc)₃ (A) と (GlcNAc)₄ (B) に *N*-アセチル-β-ヘキソサミニダーゼを作用させた反応液の HPLC 分析

GlcNAc, *N*-アセチルグルコサミン; (GlcNAc)₂, キトビオース; (GlcNAc)₃, キトトリオース; (GlcNAc)₄, キトテトラオース. N. Shirasaka, *et al.*: *J. Appl. Glycosci.*, **66**, 83-88 (2019) より再掲載.

発現させ、調製した酵素サンプルを用いて酵母の細胞壁への作用性を評価した。選抜された酵素を工業スケールで製造し、グルカナーゼ製剤として上市している¹⁸⁾。酵素反応前後の酵母の電子顕微鏡写真を図1に示す。酵素処理により酵母の外形を残したまま、細胞壁だけが削られたようになった状態が観察される。本製品は、夾雑酵素をほとんど含まず、50～60℃での反応が可能であり、耐熱性が高いことを特徴としている。酵母エキス製造時にプロテアーゼと併用すると生産効率がさらに高くなり、収率がプロテアーゼのみの場合と比較して約1.5倍まで高くなることを明らかにしている。同処理を用いることにより、製造残渣を大幅に低減できる。また、キノコグルカンに作用することも確認している¹⁹⁾。

4. キチナーゼ

放線菌は、キチン質を加水分解する酵素を持つことが知られている。弊社では、GH18, GH19, GH20に属するキチン分解酵素を製品化している。食品添加物の定義として

は、各種微生物の培養物から得られたキチン質を加水分解する酵素である。キチナーゼ活性試験法として、エチレングリコールキチンや *p*-ニトロフェニル 2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシド、*p*-ニトロフェニルジ-*N*-アセチル-β-キトビオシドを基質として酵素反応を行い、還元糖の生成や *p*-ニトロフェノールの生成を検出する方法で加水分解を確認する方法が挙げられている¹⁷⁾。GH18およびGH19に属するキチナーゼ (EC 3.2.1.14) は、キチンからオリゴ糖を生成する^{20,21)}。一方GH20に属する *N*-アセチル-β-ヘキソサミニダーゼ (EC 3.2.1.52) は、キチンオリゴ糖から *N*-アセチルグルコサミンを生成する²²⁾。これらの酵素の併用によって、キチンからの *N*-アセチルグルコサミン生成量を向上させることができる²⁰⁾。

GH19ファミリーのキチナーゼは、主に2糖のα-アノマーを生成する *inverting* タイプであることを確認した。一方、GH18ファミリーのキチナーゼ (DENAZYME CBB) は、主に2糖のβ-アノマーが生成する *retaining* タイプ、GH20ファミリーの *N*-アセチル-β-ヘキソサミニダーゼ

(DENAZYME CET) は、単糖 *N*-アセチルグルコサミンの β -アノマーが生成する retaining タイプであることを確認した (図 2)。 *N*-アセチル- β -ヘキシサミニダーゼ (GH20) については結晶構造解析が報告されており²³⁾、本製品も同様の作用メカニズムであると考えられる。

5. その他の酵素

新奇酵素として、放線菌より β -L-アラビノピラノシダーゼ (EC 3.2.1.88) を発見した。本酵素は、高等植物の細胞表面プロテオグリカンであるアラビノガラクトナン-プロテイン (AGP) を修飾するアラビノピラノース側鎖を切断するエキソ型酵素である。本酵素は転移反応も触媒することから、さまざまな配糖体を合成することができる²⁴⁾。AGP は、高等植物の細胞表面に存在し、植物の分化・生長過程において重要な役割を果たすことが示唆されている。食品分野で増粘多糖類の一種として利用されているガムアラビックやカラマツアラビノガラクトナンも、AGP の一種である。一方、ガムアラビックを炭素源とした *Streptomyces avermitilis* 培養液中に最も高い酵素活性として β -L-アラビノピラノシダーゼ活性を検出し、本酵素活性を示す酵素の N 末端アミノ酸配列から酵素遺伝子配列を特定した。放線菌発現系にて *S. avermitilis* NBRC14893 由来の β -L-アラビノピラノシダーゼの大量発現に成功し、結晶化、構造解析にも成功した²⁵⁾。本酵素は触媒ドメインが GH27 に属し、C 末端に CBM13 を有し、さらに両ドメイン間には 100 アミノ酸程の未分類配列を有するユニークなモジュール構造を持つ酵素であった。GH27 に属する酵素は α -ガラクトシダーゼ活性を有する酵素が多い中、本酵素がどのようにアラビノース加水分解能を発揮するかを明らかにするために、X 線結晶構造解析により L-アラビノースとの複合体構造を決定した。また、E99D 部位特異変異酵素の pNP- β -アラビノピラノシドへの作用性が低くなり、pNP- α -ガラクトピラノシドへの作用性が高まったことから、本酵素の基質結合様式を明らかにした²⁶⁾。

アラビナンやアラビノガラクトナンには作用しないが、アラビノキシランから L-アラビノースを生成する酵素として、GH62 に属する *S. coelicolor* 由来の α -L-アラビノフラノシダーゼ (EC 3.2.1.55) がある。弊社はこの酵素の発現に成功し、X 線結晶構造も明らかとしている²⁷⁾。活性部位におけるアラビノキシロオリゴ糖の結合モデルと部位特異変異酵素の基質反応性を調べることにより、GH62 酵素の基質特異性メカニズムを提案している。

GH74 に属する *S. avermitilis* 由来のキシログルカナーゼ (EC 3.2.1.151) については、CBM2 を有するものとドメインを欠失した二つの酵素の大量発現に成功している²⁸⁾。両酵素にタマリンドキシログルカンやキシログルカン由来オリゴ糖を作用させたときの分解生成物パターンから、CBM2 を有しない酵素は典型的なエンド型の分解パターンを示したのに対し、CBM2 を有する酵素はプロセッシブなエンド型の分解パターンを示すとともに、水溶性セルロー

スや大麦 β グルカン、こんにゃくグルコマンナン、ローカストビーンガムといった β -1,4-グルカン多糖との親和性も示した。

S. avermitilis 由来の α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1) は、澱粉の加水分解時にグルコースは生成せず、マルトースやマルトトリオースを主に生成する²⁹⁾。本酵素はカルシウムイオン共存下で至適温度が 25 °C から 50 °C へシフトする特徴を持っており、マルトオリゴ糖生産に利用可能である。また、*S. avermitilis* および *Streptomyces griseus* 由来の α -アミラーゼの内、マルトトリオースを優勢的に生成する α -アミラーゼも見出している³⁰⁾。

米ぬかは最も多くのフェルラ酸を含んでいるにもかかわらず、年間 100 万トンも廃棄される未利用バイオマスである。フェルラ酸は、フィトケミカルとして植物の細胞壁などに存在する有機化合物であり、アルツハイマー型認知症の進行を食い止めるのに有効と期待されている。また、血糖値をコントロールする酵素の一つである小腸 α -グルコシダーゼの阻害活性も有する。そこで、米ぬかの有効利用として、酵素によるフェルラ酸製造法の開発を行った。フェルラ酸エチルエステルをモデル基質として、各種市販酵素中のフェルラ酸エステラーゼ (FAE, EC 3.1.1.73) 活性を調査したところ、FAE 活性の高い市販酵素を見出した³¹⁾。しかし当該酵素のみではフェルラ酸製造が不十分であったため、ヘミセルラーゼ関連の放線菌由来酵素 43 種との併用処理を行ったところ、フェルラ酸生成を向上させる酵素としてキシラナーゼ (EC 3.2.1.8) と α -L-アラビノフラノシダーゼ (EC 3.2.1.55) を選抜し、米ぬかや小麦フスマに対する同酵素を用いた酵素処理によるフェルラ酸生成向上の相乗効果を見出した。一方で、放線菌由来酵素から、FAE 活性を持つ酵素の探索を目的として、リパーゼ (EC 3.1.1.3) やエステラーゼ (EC 3.1.1.-) として推測されている酵素遺伝子を放線菌発現系にて酵素生産し、調製した 43 酵素にて FAE 活性を調べたところ、2 酵素で FAE 活性を確認した。それらはいずれも *Streptomyces cinnamononeus* 由来の酵素であり、脱脂米ぬかに作用させた場合もフェルラ酸の生成を確認することができた³²⁾。既知のフェルラ酸エステラーゼにはこれらの酵素と類似の塩基配列を持つものではなく、本酵素はリパーゼやセリンプロテアーゼ (EC 3.4.21.-) に見られる α/β ヒドロラーゼに分類される蛋白質構造であったが、当該酵素の特有のループ構造が FAE 活性発現に寄与していることが明らかになっている³³⁾。

他にも放線菌は機能未知な酵素遺伝子を保持しており、今後も新機能を有する酵素の発見、さらには有用な糖質合成への応用が可能であることが予測される。こういった研究開発から、製品化に至ることを期待している。

6. 食品分野への新たな応用展開

グルカナーゼ、キチナーゼの食品への新たな応用展開を考えるにあたり、真菌類の細胞壁構成成分に着目すると、

供試菌： *Trichoderma viride*

供試菌： *Fusarium solani*

図3. グルカナーゼおよびキチナーゼによるカビの生育阻害

DENAZYME GEL とは、グルカナーゼ製剤液状製品名を表す。XGP-403 とは、キチナーゼ製剤開発品名を表す。(A) 1, blank ; 2, DENAZYME GEL 2.5 μ L ; 3, DENAZYME GEL 5.0 μ L ; 4, DENAZYME GEL 10.0 μ L ; 5, DENAZYME GEL 15.0 μ L ; 6, DENAZYME GEL 20.0 μ L. (B) 1, blank ; 2, XGP-403 20 pmol ; 3, XGP-403 100 pmol ; 4, XGP-403 200 pmol ; 5, XGP-403 500 pmol ; 6, XGP-403 1,000 pmol.

図4. *N*-アセチル- β -ヘキソサミニナーゼを作用させた *Aspergillus niger* 菌糸体の顕微鏡写真

(A) 20 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) を作用させたもの。(B) 当該酵素を含む緩衝液を作用させたもの。矢印 ($\rightarrow$) は膨潤や破砕が観察される菌糸先端部。N. Shirasaka, et al.: *J. Appl. Glycosci.*, **66**, 83-88 (2019) より再掲載。

食品に関係するカビ, *Mucor* 属, *Aspergillus* 属, *Fusarium* 属など真菌類の多くは, グルカンとキチンが主要な構成成分であることが報告されている³⁴⁾。

一方で, 植物は多様なグルカナーゼやキチナーゼを生産することが知られており, 植物病原菌への生体防御蛋白としての機能も報告されている³⁵⁾。放線菌 (*Streptomyces* 属) は菌体外に様々な分解酵素を分泌することが知られており, キチナーゼやグルカナーゼも含まれる¹³⁾。放線菌由来のキチナーゼが抗菌活性を示す報告があることから³⁶⁾, 弊社の製品化したキチナーゼやグルカナーゼについてカビ類の生育阻害試験を行ったところ, グルカナーゼによる *Trichoderma viride* の生育阻害, 及び, キチナーゼ (GH19) による *Fusarium solani* の生育阻害を認め, 酵素濃度依存的に生育阻害が強くなることを確認した (図3)。*N*-アセチル- β -ヘキソサミニナーゼについても, *Aspergillus niger* に対する生育阻害を示すことを確認した (図4)²³⁾。

乳製品の例としてナチュラルチーズ, 調理食品としてポテトサラダにおけるグルカナーゼおよびキチナーゼの抗カビ性を認め, 抗カビ性が向上した乳製品または調理食品の製造方法を提供している³⁷⁾。日持ち向上や食品ロス低減の

観点から, 様々な食品分野で応用可能と考えている。

7. おわりに

酵素は食品および工業分野で幅広い用途に使用されている。また, 酵素反応産物の利用性も高い。食品分野だけでも, 製パン, 卵加工, 和洋菓子, 食肉加工, 乳製品など多岐にわたる展開が可能であり, 特にグルカナーゼとキチナーゼについては, それぞれ酵母エキスと健康食品へ利用されている。さらに, 本稿で紹介したグルカナーゼとキチナーゼの抗カビ活性は, 食品の日持ち向上や食品ロス低減の観点で, 大きなポテンシャルを持つものと考えられる。今後, 食品分野への展開として, 日持ち向上や食品ロス低減をコンセプトに, 新たな用途提案を進めていきたいと考えている。

謝辞

この度は荣誉ある日本応用糖質科学会技術開発賞受賞にあたり, ご選考いただきました選考委員会の諸先生方, ご推薦を受け賜りました近畿支部の支部長阪本龍司先生 (大阪府立大学教授) をはじめ理事の皆様に厚く御礼申し上げます。

ます。本研究を進めるにあたり、放線菌発現技術にご興味を抱き、共同研究頂いた金子哲先生（現 琉球大学教授）、畑中唯史先生（岡山県農林水産総合センター専門研究員）、近藤昭彦先生（神戸大学教授）、荻野千秋先生（神戸大学教授）に深く感謝いたします。本研究を共に進めている長瀬産業株式会社ナガセ R&D センターの研究員の皆様ならびにナガセケムテックス株式会社生化学品事業部の社員の皆様に深く感謝いたします。

文献

- 宮道慎二：「放線菌の分類と同定」，日本放線菌学会編，（財）日本学会事務局センター，東京，pp. 3-19 (2001)。
- G. Chandra and K.F. Chater: Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences. *FEMS Microbiology Reviews*, **38**, 345-379 (2014)。
- S.H. Bhosale, M.B. Rao, and V.V. Deshpande: Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological Reviews*, **60**, 280-300 (1996)。
- M. Kieliszek and A. Misiewicz: Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, **59**, 241-250 (2014)。
- 日本酵素協会：酵素一覧。 https://j-enzyme.com/enzyme_top.html (取得日：2019年10月17日)。
- D.A. Hopwood, D.J. Lydiate, F. Maltpartida, and H.W. Wright: Conjugative sex plasmid of *Streptomyces*. Plasmids in bacteria. *Basic Life Science*, 615-634 (1985)。
- T. Kieser, D.A. Hopwood, H.M. Wright and C.J. Thompson: pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Molecular and General Genetics*, **185**, 223-238 (1982)。
- T. Hatanaka, H. Onaka, J. Arima, M. Uraji, Y. Uesugi, H. Usuki, Y. Nishimoto, and M. Iwabuchi: pTONA5: a hyperexpression vector in *Streptomyces*. *Protein Expression and Purification*, **62**, 244-248 (2008)。
- C. Ogino, M. Kanemasu, Y. Hayashi, A. Kondo, N. Shimizu, S. Tokuyama, Y. Tahara, S. Kuroda, K. Tanizawa, and H. Fukuda: Over-expression system for secretory phospholipase D by *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**, 823-828 (2004)。
- F. Rafii, and D.L. Crawford: Transfer of conjugative plasmids and mobilization of a nonconjugative plasmid between *Streptomyces* strains on agar and in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 1334-1340 (1988)。
- M. Metsä-Ketelä, L. Halo, E. Munukka, J. Hakala, P. Mäntälä, and K. Ylihpnko: Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 4472-4479 (2002)。
- 厚生労働省。安全性審査の結果，組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続第3条第5項の規定を適用した品目一覧（セルフクロニング，ナチュラルオカレンス，高度精製品）。 <https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000555637.pdf> (取得日：2019年10月17日)。
- K.F. Chater, S. Biró, K.J. Lee, T. Palmer, and H. Schrempf: The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*, **34**, 171-198 (2010)。
- H-M. Wu, S-W. Liu, M-T. Hsu, C-L. Hung, C-C. Lai, W-C. Cheng, H-J. Wang, Y-K. Li, and W-C. Wang: Structure, mechanistic action, and essential residues of a GH-64 enzyme, laminaripentaose-producing-1,3-glucanase. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 26708-26715 (2009)。
- T. Harada: The Story of research into curdlan and the bacteria producing it. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **4**, 309-317 (1992)。
- K.L. Shetha, S-W. Liu, C-P. Huang, H-M. Wu, W-C. Wang, and Y-K. Li: Characterization and identification of essential residues of the glycoside hydrolase family 64 laminaripentaose-producing- β -1, 3-glucanase. *Protein Engineering, Design and Selection*, **24**, 617-625 (2011)。
- 厚生労働省：食品添加物第9版公定書。 <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000192874.pdf>. (取得日：2019年10月17日)。
- 牧野洋介：グルカナーゼ製剤「デナチーム GEL」の機能と酵母エキスの製造における効果。月刊フードケミカル，**10**, 35-37 (2012)。
- ナガセケムテックス株式会社，長瀬産業株式会社，門上剛：キノコ分解用酵素製剤，特開 2014-42512，2014-03-13。
- N. Nguyen-Thi and N. Doucet: Combining chitinase C and N-acetylhexosaminidase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) provides an efficient way to synthesize N-acetylglucosamine from crystalline chitin. *Journal of Biotechnology*, **20**, 25-32 (2016)。
- T. Ohno, S. Amand, T. Hata, N. Nikaidou, B. Henrissat, M. Mitsutomi, and T. Watanabe: A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal of Bacteriology*, **178**, 5065-5070 (1996)。
- N. Shirasaka, K. Harazono, R. Nakahigashi, K. Mitsui, J. Tanaka, S. Tanazawa, M. Mitsutomi, and T. Ohnuma: Characterization of a GH Family 20 Exo- β -N-acetylhexosaminidase with antifungal Activity from *Streptomyces avermitilis*. *Journal of Applied Glycoscience*, **66**, 83-88 (2019)。
- B.L. Mark, D.J. Vocadlo, S. Knapp, B.L. Triggs-Raine, S.G. Withers, and M.N.G. James: Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial β -hexosaminidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 10330-10337 (2001)。
- 長瀬産業株式会社，独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構，西本幸史，金子哲，一ノ瀬仁美： β -L-アラビノピラノシダーゼ，特開 2009-153516，2009-07-16。
- Z. Fujimoto, H. Ichinose, K. Harazono, M. Honda, A. Uzura, and S. Kaneko: Crystallization and preliminary crystallographic analysis of β -L-arabinopyranosidase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, **65**, 632-634 (2009)。
- H. Ichinose, Z. Fujimoto, M. Honda, K. Harazono, Y. Nishimoto, A. Uzura and S. Kaneko: A β -L-Arabinopyranosidase from *Streptomyces avermitilis* is a novel member of glycoside hydrolase family 27. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 25097-25106 (2009)。
- T. Maehara, Z. Fujimoto, H. Ichinose, M. Michikawa, K. Harazono, and S. Kaneko: Crystal structure and characterization of the glycoside hydrolase family 62 α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces coelicolor*. *The Journal of Biological Chemistry*, **289**, 7962-72 (2014)。
- H. Ichinose, Y. Araki, M. Michikawa, K. Harazono, K. Yaoi, S. Karita, and S. Kaneko: Characterization of an endo-processive-type xyloglucanase having a β -1,4-glucan-binding module and an endo-type xyloglucanase from *Streptomyces avermitilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 7939-45 (2012)。
- S.Y. Hwang, K. Nakashima, N. Okai, F. Okazaki, M. Miyake, K. Harazono, C. Ogino, and A. Kondo: Thermal stability and starch degradation profile of α -amylase from *Streptomyces avermitilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **77**, 2449-2453 (2013)。
- N. Kashiwagi, M. Miyake, S. Hirose, M. Sota, C. Ogino, and A. Kondo: Cloning and starch degradation profile of maltotriose-producing amylases from *Streptomyces* species. *Biotechnology Letters*, **36**, 2311-2317 (2014)。
- M. Uraji, M. Kimura, Y. Inoue, K. Kawakami, Y. Kumagai, K. Harazono, and T. Hatanaka: Enzymatic production of ferulic acid from defatted rice bran by using a combination of bacterial enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **171**, 1085-1093 (2013)。
- M. Uraji, J. Arima, Y. Inoue, K. Harazono, and T. Hatanaka: Application of two newly identified and characterized feruloyl esterases from *Streptomyces* sp. in the enzymatic production of ferulic acid from agricultural biomass. *PLoS One*, **9**, e104584 (2014)。
- M. Uraji, H. Tamura, E. Mizohata J. Arima, K. Wan, K. Ogawa, T. Inoue, and T. Hatanaka: Loop of *Streptomyces* feruloyl esterase plays an important role in the enzyme's catalyzing the release of ferulic acid from biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, **84**, e02300-e02317 (2018)。

- 34) N.A.R. Gow, J.P. Latge, and C.A. Munro: The Fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, **5**, 1–25 (2017).
- 35) F. Mauch, B. Mauch-Mani, and T. Boller: Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology*, **88**, 936–942 (1988).
- 36) Y. Itoh, T. Kawase, N. Nikaidou, H. Fukada, M. Mitsutomi, T. Watanabe, and Y. Itoh: Functional analysis of the chitin-binding domain of a family 19 chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037: substrate-binding affinity and cis-dominant increase of antifungal function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **66**, 1084–1092 (2002).
- 37) ナガセケムテックス株式会社, 長瀬産業株式会社, 白坂直輝, 山口仁美: 乳製品または調理食品用抗カビ剤, ならびに抗カビ剤が向上した乳製品または調理食品の製造方法, 特開 2014–198018, 2014–10–23.