有機酸発酵と炭酸固定

立 花 精^{*1}

1 緒 言

有機酸発酵の歴史は古いが、現在なおクエン酸、酢酸、グルコン酸その他が発酵生産せられ、それらの生産高も年々増加を続けている。将来もこれら有機酸をはじめさらに他の既知ならびに未知の有機酸が発酵生産される可能性は極めて強い。これらに関して武富の総説¹⁾に述べられている通りである。

さて有機酸発酵を含めて、一般に発酵工業の原料は従来農産資源の炭水化物が主なものであったが、現在では次第に鉱産資源である石油に移行する趨勢にある。

将来もし石油以外にその原料を求めるとすれば、それは二酸化炭素であろう。

二酸化炭素を原料として有機化合物を発酵生産しようとするばあい、まずその対象として考えられるのは有機酸であろう。多くの有機酸が炭酸固定反応を経て生成される経路が解明され、炭酸固定反応を利用する有機酸の発酵生産の理論的可能性ができた。また炭酸固定で生成する有機酸は、生合成経路上アミノ酸、核酸塩基および糖などの前駆物質ともなりうるので、この方式による有機酸発酵の道は、これら有機酸以外の有機化合物の炭酸固定による発酵生産の道にも通ずることになる。

上記の観点から、微生物の有する炭酸固定能を最大限に発揮せしめて、有機酸の発酵生産に与からしめようとする場合、先ず必要となるのは炭酸固定反応そのものに関する基礎的な知識であろう。そこで本総説では現在までに明らかにせられた炭酸固定の諸反応式をあげ説明し、ついで 1, 2 の有機酸の発酵生産を例にとり、それらの炭酸固定による発酵生産にどのように炭酸固定酵素を関与せしめるか、またそのさいの Bioenergetics はどのようなかなどを論じ、この方式の可能性を裏付けようと思う。

2 炭酸固定反応と微生物

微生物の中には、光合成細菌に見られるように極めて少数ながら無機物である二酸化炭素を資化し菌体を合成して増殖を行なっている Autotrophic (自家栄養的) な微生物もあるが、大多数は Heterotrophic (従属栄養的) で動物、植物の死がいをはじめ有機物を分解し、最終的には二酸化炭素と水にまで分解してしまう特徴を有している。このため微生物は地球上の掃除役であるとする見方もあるほどである。したがって従来の発酵生産はこのような有機物の分解過程に現われてくる特定の化合物を一定の条件下で蓄積せしめることから成立していることになる。例えば Fermentation (発酵) の語源であるとされる Boiling さながらの現象を呈する酵母の酒精発酵では、ブドウ糖を嫌氣的に分解させて、その炭素の 1/3 を二酸化炭素として放出させ、2/3 を酒精としてえているのである。

ところがこのような従属栄養型の微生物に、よもやと思われた炭酸固定能が存在することが明らかとなったのである。1936 年 Wood と Werkman²⁾ はプロピオン酸菌によるプロピオン酸発酵の研究から (1) 式で示されるような、1 mol のピルビン酸と 1 mol の二酸化炭素から 1 mol のオギザロ酢酸が生成する炭酸固

定反応を見出した。これはのちに Wood-Werkman 反応と呼ばれるようになったが、この反応は全生物を通じて、最初に発見された炭酸固定反応である。これに次いで各種の炭酸固定反応が見い出されてきたが、それらの多くは、本来炭酸固定反応が顕著に起こっていると推測される緑色植物、光合成細菌をさておいてむしろプロピオン酸菌のような発酵を営む微生物に見見されていることは興味あることである。

3 炭酸固定反応

微生物における炭酸固定反応の普遍的存在は疑う余地のないところである。しかし炭酸固定反応が存在するからといって、必ずしも炭酸固定反応によって生成された有機化合物を菌体外に生産する (著者はこれを炭酸固定反応と呼んだ)³⁾ とは限らぬだろう。発酵は Exergonic (発エルゴンの) であるのに対して、炭酸固定反応は、例えば (1) 式が 6 kcal/mol の Endothermic な反応であることからわかるように、わずかではあるが Endergonic (吸エルゴンの) である。光合成細菌などのように系外からエネルギーを求める手段をもたぬ微生物にあっては、系内すなわち菌体内の有機物の分解によって生じたエネルギーをもって炭酸固定反応を進めているにちがいない。したがって菌体外生産を考えるに当って Bioenergetics の立場で先ず炭酸固定反応を十分考察しておくことが必要であろう。

表 1 に現在までに知られた炭酸固定酵素の名称、反応式などを示した。ここにかかげた 11 種類の中、その酵素はピオチンを補酵素とするものと、補酵素のないものの 2 群からなり、その反応型式は可逆と不可逆の 2 群にわけられる。Pyruvate carboxylase, Acetyl CoA carboxylase, Propionyl CoA carboxylase, Methylcrotonyl CoA carboxylase および Phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase がピオチン酵素であり、他は補酵素を必要としない。Phosphopyruvate carboxylase および Ribulosediphosphate carboxylase が不可逆で他は可逆反応を触媒する。この 2 不可逆反応は主として緑色植物および光合成細菌などに見い出されるが、前者は大腸菌にも見い出された。3 種の Acyl CoA carboxylase の中で Acetyl CoA carboxylase は高級脂肪酸生合成に関与する酵素であり、生成した Malonyl CoA は Acyl CoA との縮合にさいして、脱炭酸されるのでこの式中の二酸化炭素は生成する脂肪酸中には入らない。この点他の炭酸固定酵素とは機能を異にする。

さてオギザロ酢酸を生成する酵素には 5 種類あるが、Pyruvate carboxylase は微生物、動物、植物全般に広く分布していること

*1 Sei TACHIBANA 立命館大学理工学部化学科：京都市北区等持院北町。

表 1 炭 酸 固 定 酵 素

酵 素 名	反 応 式	ビオチン関 与の有(+) 無(-)	所 在	研 究 者
Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1)	$\text{CO}_2 + \text{Pyruvate} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{OAA} + \text{ADP} + \text{Pi}$	+	<i>Propionibacterium</i>	Wood (1936)
Phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31)	$\text{CO}_2 + \text{PEP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OAA} + \text{Pi}$	-	<i>Escherichia</i>	Cánovas (1965)
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.32)	$\text{CO}_2 + \text{PEP} + \text{GDP (or IDP)} \rightleftharpoons \text{OAA} + \text{GTP (or ITP)}$	-	<i>Pigeon liver</i>	Utter (1954)
Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase system	$\text{CO}_2 + \text{PEP} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{OAA} + \text{ATP}$	-	<i>Aspergillus</i>	Woronick (1960)
Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase (EC 4.1.1.38)	$\text{CO}_2 + \text{PEP} + \text{Pi} \rightleftharpoons \text{OAA} + \text{PPi}$	-	{ <i>Propionibacterium</i> <i>Schizophyllum</i> }	Siu (1962) Tachibana (1962)
Malic enzyme (EC 1.1.1.38, 39, 40)	$\text{CO}_2 + \text{Pyruvate} + \text{NADH}_2 \text{ (or NADPH}_2\text{)} \rightleftharpoons \text{L-Malate} + \text{NAD (or NADP)}$	-	<i>Lactobacillus</i>	Kaufmann (1951)
Acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2)	$\text{CO}_2 + \text{Acetyl-CoA} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Malonyl-CoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$	+	<i>Saccharomyces</i>	Lynen (1959)
Propionyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.3)	$\text{CO}_2 + \text{Propionyl-CoA} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Methylmalonyl-CoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$	+	<i>Propionibacterium</i>	Lardy (1956)
Methylcrotonyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.4)	$\text{CO}_2 + 3\text{-methylcrotonyl-CoA} + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 3\text{-methylglutaconyl-CoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$	+	<i>Mycobacterium</i>	Lynen (1959)
Ribulosediphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39)	$\text{CO}_2 + \text{Ribulose 1,5-diphosphate} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \times 3\text{-phospho-D-glycerate}$	-	<i>Chlorella</i>	Calvin (1957)
Phosphoribosyl-aminoimidazole carboxylase (EC 4.1.1.21)	$\text{CO}_2 + 5\text{-amino-imidazole-ribonucleotide} \rightleftharpoons 4\text{-carboxy-amino-imidazole-ribonucleotide}$	+	<i>Pigeon liver</i>	Greenberg (1954)

が判明しつつあるが、他の4種は未だ分布は明らかでなく、中にはかなり偏在しているものもあるよう推測される。例えば Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase system は *Saccharomyces cerevisiae* と *Aspergillus niger* に、Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase は *Propionibacterium shermanii* と *Schizophyllum commune* に見い出されただけである。

Malic enzyme には3種類知られていて、NADあるいはNADPが関与する。これはむしろ逆反応、すなわち脱炭酸反応に意義があり、特にそのさい生成するNADPH₂はAcetyl CoA carboxylaseの関与する高級脂肪酸生成の還元剤として消費される。Phosphoribosyl-amino-imidazole carboxylaseはプリン塩基生成に不可欠であり分布は広い。

さて以上の炭酸固定反応の中でBioenergeticsの立場から特に興味をひくのはPhosphoenolpyruvate (PEP)を二酸化炭素の受容体としオキサロ酢酸とともに高エネルギーリン酸化化合物を生成する酵素である。PEPのリン酸結合エネルギーは $-\Delta F^\circ = 12.4$ kcal/molであり、GTP, ATPとともに約 $-\Delta F^\circ = 7.0$ kcal/molを末端リン酸結合に有し、Inorganic pyrophosphate (PPi)はそのリン酸結合エネルギーは $-\Delta F^\circ = 6.0$ kcal/molとされているのでPhosphoenolpyruvate carboxykinase, Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase system, Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylaseの炭酸固定反応は極めてエネルギー効率の高いものである。特に前2者はそのためこの逆反応でPEPを生成し、糖新生にいたる経路へピルビン酸をのせる役目を果たしているとされている。

次に関与する酵素名も知られていない、未確定の炭酸同化反応を表2に示す。これらの中でコハク酸から α -ケトグルタル酸の生成する反応は明らかなEndothermicな反応であり、そのためにTCA回路の逆転が防がれているくらいであるから、極めて成

立困難な反応であるが、大腸菌に認められたということは注目値する。これら諸反応は将来さらに研究を進めねばならぬ。

4 脱炭酸反応

炭酸固定による発酵生産にあたっては炭酸固定反応を促進する手段を講ずるとともに、脱炭酸反応を防ぐことも必要である。脱炭酸酵素の中にはピルビン酸の酸化的脱炭酸酵素および α -ケトグルタル酸の酸化的脱炭酸酵素があり、この両者はともに代謝の流れを分解の方向に向け、その逆流どめの役目を果たしており、したがってこれらをいかにして抑制するかは重要な課題である。これらはともにビタミンB₁およびリボ酸を補酵素の一部とする複合酵素であり、補酵素レベルでの調節が可能と考えられる。

5 炭酸固定反応機構

上に述べたように、炭酸固定反応にはビオチン関与の有無の二つの型がある。この両者間には反応機構にいくらかの相違点があるか興味のあるところである。また反応に与かる二酸化炭素の存在形態はCO₂とHCO₃⁻のいずれであるかも興味深い問題である。

5.1 ビオチン酵素

Lynen ら⁴⁾は *Mycobacterium* の Methylcrotonyl CoA carboxylase の研究の結果、図1に示す作用機構を提出した。図に示される通り中間体として1'のNのカルボキシル化されたビオチン

図 1 Methylcrotonyl CoA carboxylase の作用機構

表 2 未確定の炭酸同化反応

反 応 式	微 生 物
$\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{Formate} + \text{Acetate} \rightleftharpoons \text{Pyruvate}$	<i>E. coli</i>
$2 \text{Ethanol} + \text{CO}_2 \rightarrow 2 \text{Acetate} + \text{CH}_4$	<i>M. omelianskii</i>
$\text{H}_2 + \text{CO}_2 + \text{Acetate} \rightleftharpoons \text{Pyruvate}$	<i>C. butylicum</i>
$4 \text{H}_2 + 2 \text{CO}_2 \rightarrow \text{Acetate} + 2 \text{H}_2\text{O}$	<i>C. acetium</i>
$\text{H}_2 + \text{CoA} + \text{Acetylphosphate} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{Pyruvate} + \text{CoA} + \text{Pi}$	<i>C. kluyveri</i>
$\text{Succinate} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \alpha\text{-Ketoglutarate}$	<i>E. coli</i>
$\alpha\text{-Ketoglutarate} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}_2 \rightleftharpoons \text{Isocitrate} + \text{NADP}$	<i>E. freundii</i>

化合物が生成しなければならぬとした。ところがその後 Wakil ら⁸⁾は Acetyl CoA carboxylase ではピオチンの Ureido の CO と CO₂ の交換が起こると唱え、Lynen らの説と対立した。しかし Wood ら⁹⁾の追試の結果は前者すなわち Lynen らの説を支持している。

5.2 CO₂ と HCO₃⁻

反応に与かるのが CO₂ かそれとも HCO₃⁻ であるかは重要な問題である。Kaziro ら⁷⁾は Propionyl CoA と Phosphoenolpyruvate carboxylase はともに HCO₃⁻ が炭酸固定反応に与かるとした。また Maruyama ら⁸⁾はピオチン酵素でない Phosphoenolpyruvate carboxykinase も同様 HCO₃⁻ であるとした。ところが Cooper ら⁹⁾によるとピオチン酵素でない Phosphoenolpyruvate carboxykinase および Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase は CO₂ であって HCO₃⁻ でないという結果を得ている。また彼らはピオチン酵素である Pyruvate carboxylase は同じくピオチン酵素である Propionyl CoA carboxylase 同様 HCO₃⁻ であることも見い出して、ピオチン酵素でない Phosphoenolpyruvate carboxylase が HCO₃⁻ であるとする Kaziro らの説および相反する Maruyama らの説と意見を異にしている。

図 2 Maruzama らの Phosphoenolpyruvate carboxylase 反応機構

以上のようにピオチン酵素の作用機構ならびに二酸化炭素の反応形態に関しては異論があり、結論が待たれる現状であるが、これらの問題は Carbonic anhydrase との関係もあり、また二酸化炭素の供給形式とも関連して生化学的にも工学的にも重要である。

6 L-リンゴ酸発酵

L-リンゴ酸は炭酸固定によって発酵生産可能な有機酸として最も有望なものの一つである。しかし L-リンゴ酸は他方 TCA 回路ならびにグリオキシル酸側路を経ても生成される。

黄麹菌による当該有機酸の発酵生産の研究結果から、対糖収率 60% 前後で生産されることがわかり、ついでその生成機構の研究がなされ、黄麹菌においては TCA 回路とグリオキシル酸側路から生成されてくることが判明した¹⁰⁾。理論収率は前者で 74%、後者で 111% となる。実験で得られた収率は 63% であり、TCA 回路とグリオキシル酸側路を経ていることが裏書きされた。ビタミン B₁ を合成し得ない黄麹菌の変異株を使用すればこの収率をさらに高めることも可能かも知れない。

1960 年著者は担子菌の一株 *Schizophyllum commune* (スエヒロタケ) が L-リンゴ酸を生産することを見い出し³⁾、ついでこれが CaCO₃ とブドウ糖から、対糖収率 95% に達する高収率の L-

リンゴ酸発酵を営むことも見い出した¹¹⁾。その発酵機構の研究の結果、主生成経路は Phosphoenolpyruvate の還元的カルボキシル化であって、解糖作用で生成する NADH₂ がその還元に使われることが判明した。このカルボキシル化には主として Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase が作用することも判明した¹²⁾。反応式で示せば (2) 式のようになる。すなわち 1 mol のブドウ糖と 2 mol の二酸化炭素および 2 mol のオルトリ

ン酸から 2 mol の L-リンゴ酸と 2 mol の PPi が生成し、L-リンゴ酸の対糖理論収率は 148% となる。この無機ピロリン酸は ATP の代用として Glucose-6-phosphate の生成に消費されたり、あるいは ADP からの ATP の生成に役立ったりする可能性がある。この式は Bioenergetics 上無理のないものと言える。またこのスエヒロタケはビタミン B₁ 要求株であることも判明し、PEP から一部生成すべきビルビン酸の酸化的脱炭酸反応はもとより、ペントーズリン酸経路のトランスケラーゼ反応も制限を受けることが推論できる。あるいは L-リンゴ酸と NAD の共存で Glucose-6-phosphate 脱水素酵素反応が抑制されることも判明した¹³⁾。したがって (2) 式の成立はいよいよ有望である。これと別に Pyruvate carboxylase 活性も認められたが、これがカルボキシル化の主反応とすれば ATP 消費反応であるので (2) 式にかわって (3) 式が成り立つ。しかしこの式は高エネルギー

リン化合物の生成を伴わないから、Bioenergetics 上成立し難い。恐らく Pyruvate carboxylase は特殊な場合以外は作動しないものと推論される。以上要するにスエヒロタケで炭酸固定発酵が実証されたことになる。

スエヒロタケ以外にもし、如上のスエヒロタケの酵素系以外にさらに Acetyl CoA synthetase (EC 6.2.1.1), Adenylate kinase (EC 2.7.4.3), グリオキシル酸側路を有する微生物が存在すると仮定すれば、1 mol のブドウ糖、2 mol の二酸化炭素および 4 mol の酢酸から 4 mol の L-リンゴ酸を生産することが可能であろう。これは (4) 式で示される。この式は 2 mol の ATP と 4 mol

の無機ピロリン酸を同時に生成するから Bioenergetics 上成立し難い。これはスエヒロタケの場合と異なって酸化発酵の一種でもある。またこれには Pyruvate carboxylase を関与せしめた

が、もし Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase を関与せしめればさらに 2 mol だけ PPI の生成が増加するはずである。しかしそのかわりに Phosphopyruvate carboxylase を関与せしめた場合はこれと同じである。もしここにも Pasteur effect の解釈に類することが適用されるとすればエネルギー効率の低いこの式の方が発酵生産に有利となろう。

さて以上は従属栄養型微生物に関する炭酸固定であったが、自家栄養型微生物では (5) 式で示される通り 4 mol の二酸化炭素から 1 mol の L-リンゴ酸の生成が起こる。従属栄養型微生物でも、もし光、電気エネルギー等の ATP, NADPH₂ などへの転換

がなんらかの形で可能となれば自家栄養型微生物同様にこの式が成立するかも知れない。なおこの式は炭酸固定反応が Phosphoenolpyruvate carboxylase 関与の場合であるが、Malic enzyme を関与せしめれば ATP が 1 mol 節約できるはずである。光合成細菌などでは当然かかる式が菌体内で進行しているにちがいないから、問題はこれをいかにして菌体外に蓄積せしめうるかにある。

7 クエン酸

Aspergillus niger によるクエン酸発酵の機構は解明されていて、ブドウ糖が解糖作用を受け 2 mol のピルビン酸となり、ピルビン酸の 1 mol は酸化の脱炭酸を受け Acetyl CoA と CO₂ となり、他は Pyruvate carboxylase の作用でこの CO₂ を固定してオキサロ酢酸となり、ついで Acetyl CoA とオキサロ酢酸は縮合酵素の作用でクエン酸と CoA になる。したがって反応は (6) 式によって表わされる。炭酸固定反応はこの Pyruvate carboxylase の他に Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase system も知られている通り確かに存在¹⁴⁾しクエン酸生成に不可欠とされているが、収支論的には一種の炭酸転移反応に等しい¹⁵⁾。ところが二酸化炭素によるクエン酸発酵の阻害の報告もあり¹⁶⁾、炭酸固定反応がこの菌では微妙な調節機構の支配下にあることが示唆される。したがってこの菌で、系外の二酸化炭素を与えてそれを固定させることは現研究段階では困難なようである。しかしこの調節機構が将来解明されるのを待つか、あるいは他に適当なクエン酸発酵菌を検索することによって炭酸固定によるクエン酸発酵が可能となる時には Acetyl CoA synthetase と Adenylate kinase を参加させることにより、1 mol のブドウ糖、2 mol の二酸化炭素ならびに 2 mol の酢酸から (7) 式にしたがって 2 mol のクエン酸生産が可能であろう。

Glucose + 8 ADP + 8 Pi + O₂ → 2 Pyruvate + 8 ATP + 2 H₂O + 8 H₂O
2 Pyruvate + 2 CO₂ + 2 ATP → 2 OAA + 2 ADP + 2 Pi
2 Acetate + 2 ATP + 2 CoA → 2 AcetylCoA + 2 AMP + 2 PPI
2 AMP + 2 ATP → 4 ADP
2 OAA + 2 Acetyl CoA + 2 H₂O → 2 Citrate + 2 CoA
Glucose + 2 CO₂ + 2 Acetate + O₂ + 2 ADP + 6 Pi → 2 Citrate + 8 H₂O + 2 ATP + 2 PPI (7)

この式によれば 2 mol のクエン酸あたり 2 mol の ATP, PPI が生成するから Bioenergetics 上成立可能である。
L-リンゴ酸の場合もそうであるが、酢酸が石油化学で安価に供給可能とすればこれらは炭水化物、石油、二酸化炭素 3 者混合原料の発酵の形となるわけである。

さて自家栄養型微生物においては L-リンゴ酸における同様

クエン酸の場合も 6 mol の二酸化炭素から 1 mol のクエン酸生産も理論的に可能のはずである。

8 結 言

以上の炭酸固定反応による有機酸発酵にかんして、まだ克服しなければならぬ多くの問題がある。たとえば外的要因の一つとして圧の問題がある。従来の発酵と異なりこの種の発酵には化学平衡上は加圧が有利のはずである。事実スエヒロタケでは発酵槽の内圧を +1.5 kg まで上げるにしたがって、L-リンゴ酸の収率が増加した¹⁶⁾。しかし発酵では一般に菌の生育を伴う関係上、その際発生すべき二酸化炭素に対する配慮も必要で、これと化学平衡との関係をいかに調整するかが重要な問題となってくる。あるいはまた内的要因には菌自体の代謝調節の問題がある。炭酸固定反応にかんするものだけでも、大腸菌の Acetyl-CoA やアスパラギン酸の作用^{17,18)}、スエヒロタケの脂肪酸の効果¹⁹⁾など既知化合物のもの、あるいはスエヒロタケの多糖類など 2, 3 の未知因子^{20,21)}の効果が知られている。その他間接的に炭酸固定反応に影響をおよぼすと考えられるところのクエン酸発酵に対するメタノールの効果^{22,23)}なども指摘することでもできる。

原料にかんすることでは空気中の二酸化炭素を有効に利用する問題が考えられる。おそらくビオチン類似の微生物に対して無毒なアミン誘導体の開発など必要となろう。

ともあれこうした問題の研究とは別に、基本的なことではあるが、変異株の造成とかあるいはすでに他の総説^{24,25)}で述べた通り、微生物全般にわたる炭酸固定反応の比較生化学的研究の上に立って、担子菌など発酵菌類としては未開拓の微生物を検索することも必要なことである。

略号: G-6-P: Glucose-6-phosphate, F-6-P: Fructose-6-phosphate, F-1,6-diP: Fructose-1,6-diphosphate, 3-PGA: 3-Phosphoglycerate, 2-PGA: 2-Phosphoglycerate, PGA: Phosphoglycerate, Pi: Orthophosphate.

一 文 献

- 1) 武富, 工化, 67, 680 (1964).
- 2) H. G. Wood, C. H. Werkman, *Biochem. J.*, 30, 48 (1936).
- 3) 立花, 醸工, 39, 696 (1961).
- 4) F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jutting, E. Ringelmann, *Angew. Chem.*, 71, 481 (1959).
- 5) M. Waite, S. J. Wakil, *J. Biol. Chem.*, 238, 77 (1963).
- 6) S. H. G. Allen, R. Stjernholm, H. G. Wood, *J. Biol. Chem.*, PC2889 (1963).
- 7) Y. Kaziro, L. F. Hass, P. D. Boyer, S. Ochoa, *J. Biol. Chem.*, 237, 1460 (1962).
- 8) H. Maruyama, R. L. Easterday, H. C. Chang, M. D. Lane, *J. Biol. Chem.*, 241, 2405 (1966).
- 9) T. G. Cooper, T. T. Tchen, H. G. Wood, C. R. Benedict, *J. Biol. Chem.*, 243, 3857 (1968).
- 10) 立花, 塩出, 醸工, 44, 581 (1966).
- 11) S. Tachibana, J. Siode, VIIIth Intern. Congr. Microbiol. Abstr. (Montreal) (1962) p. 67.
- 12) 立花, 梅原, 塩出, 日化第 17 年会講演要旨集, p. 199 (1964).
- 13) 立花, 塩出, 花井, 日化第 18 年会講演要旨集, p. 312 (1965).
- 14) C. L. Woronick, M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.*, 235, 9 (1960).
- 15) S. C. Prescott, C. G. Dunn, "Industrial Microbiology", McGraw-Hill Book Comp. Inc., New York (1959) p. 549.
- 16) 立花, 塩出, 醸工, 41, 606 (1963).
- 17) J. L. Cánovas, H. L. Kornberg, *Biochim. Biophys. Acta*, 96, 169 (1965).
- 18) 香月, 生物物理, 6, 253 (1966).
- 19) 立花, 塩出, 桜田, 日化第 20 年会講演予稿集, 4, 591 (1967).
- 20) 立花, 山本, 醸工, 41, 606 (1963).
- 21) 立花, 塩出, 醸工, 42, 704 (1964).
- 22) A. J. Moyer, *Appl. Microbiol.*, 1, 7 (1953).
- 23) 宇佐美, 武富, 醸協誌, 19, 435 (1961).
- 24) 立花, 醸協誌, 22, 210 (1964).
- 25) 立花, 醸協誌, 26, 244 (1968).