土壌より分離した *Arthrobacter* sp. No. 588 による 新 D-キシロース脱水素酵素の生産

山中 啓, 金田隆一, 堺 修造*

(香川大学農学部食品学科, *株式会社林原生物化学研究所)

昭和 51 年 9 月 20 日 受理

Production of a New Specific D-Xylose Dehydrogenase by *Arthrobacter* sp. No. 588 Isolated from Soil

By Kei YAMANAKA, Ryuichi KANEDA and Shuzo SAKAI*

Department of Food Science, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa-ken, Japan 761-07;

* Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.,

2-3, 1-chome, Shimoishii, Okayama, Japan 700

A bacterium capable of catalyzing the dehydrogenation of D-xylose with NAD was isolated from soil and was identified as *Arthrobacter* sp. The reaction product of D-xylose dehydrogenation was identified as xylonate by paper chromatography and infrared absorption spectrum.

This enzyme catalyzes the following reaction.

This enzyme has been named as NAD-D-xylose dehydrogenase, since this enzyme was specific only for the dehydrogenation of D-xylose. Cultural conditions for the enzyme production were studied. This enzyme was induced effectively only by D-xylose. Urea and ammonium salts such as $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and NH_4Cl were effective nitrogen source for the bacterial growth and the enzyme production. Addition of FeSO_4 stimulated the enzyme production remarkably.

(Received September 20, 1976)

緒 言

微生物のペントースの代謝系については、1950 年代に乳酸菌、*Aerobacter aerogenes* を中心に研究された。すなわち、D-キシロースおよび L-アラビノースは、それぞれのペントース・イソメラーゼによりケトペントースへ異性化される^(1,2)。この異性化反応を第 1 段階とする代謝系は、細菌以外に *Candida utilis* 等の酵母にも見出され^(3,4)、微生物のペントース代謝系の共通性が認められた。さらに非天然系の D-アラビノースの代謝も、同様にイソメラーゼにより共通の代謝系に組み込まれることが判明した。第 2 のペントース代謝系は、かび類 (*Penicillium chrysogenum*^(5,6), *Geotrichum candi-*

dum)⁽⁷⁻⁹⁾、酵母 (*Candida utilis*⁽¹⁰⁻¹¹⁾, *C. albicans*⁽¹²⁻¹⁵⁾) 等に見出されたペンチトールを経由する系である。すなわち、D-キシロースは D-キシロース還元酵素 (NADP 要求性, EC 1.1.1.139) によりキシリトールとなり、ついでキシリトール脱水素酵素 (NAD 要求性, EC 1.1.1.9) により D-キシロースに脱水素されて、ペントース・りん酸経路に入り代謝される。第 3 のペントースの代謝系として、ペントースに直接作用する脱水素酵素による酸化系がある。L-アラビノース脱水素酵素 (EC 1.1.1.46)^(16,17) および D-アラビノース脱水素酵素 (EC 1.1.1.127)⁽¹⁸⁻²²⁾ が、*Pseudomonas* に見出された。一方、D-キシロースの脱水素酵素の存在は、今まで全く知られていなかった。しかし、細菌、かび、酵母により D-キシ

ロースより D-キシロン酸の生成は古くより知られており⁽²⁸⁻³¹⁾, D-キシロース酸化酵素の存在が推測されたが⁽³²⁾, 酵素として精製されなかった。

われわれは、各地土壌より分離した D-キシロース資化性細菌 150 株について、D-キシロースの資化能と D-キシロース・イソメラーゼの生産能を検討するとともに、D-キシロースの酸化能の検出を行なった。その結果、すべての菌株がイソメラーゼを生産し、酸化能は全く検出されなかったが、ただ 1 分離菌株が明らかに D-キシロースを基質として NAD を強く還元することを見出した。本酵素活性を検討した結果、NAD を要求する新脱水素酵素であることを確認し、本酵素を D-キシロース脱水素酵素と命名した。本報においては、分離菌を同定し、本酵素の生産条件について検討した結果について報告する。

実験方法

1. D-キシロース脱水素酵素生産菌の分離 各地の土壌 (55 点) 約 0.5 g を 5 ml の殺菌水に懸濁し、その 1 白金耳を D-キシロースを単一炭素源とする下記組成の液体培地 5 ml に接種し、30°C で 40 時間振盪培養 (試験管振盪機による往復振盪) し、同培地に 2% 寒天を添加した分離用平板培地に塗抹して、コロニーを分離した。この操作をさらに一度繰り返して分離菌とした。分離用培地組成は、D-キシロース 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.26%, KH_2PO_4 0.24%, K_2HPO_4 0.56%, 酵母エキス 0.01%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01% であり、pH は 7.0 に補正した。D-キシロースと MgSO_4 は、上記培地とは別にオートクレーブにより殺菌した。

2. 酵素活性の測定 上記液体培地に分離菌を 1 白金耳接種し、30°C で振盪培養後、生育度および培地の pH を測定した。生育度は培養液を 10 倍に希釈し、600 nm で測定した。菌体を遠心分離で集め、上澄より残糖を Somogyi-Nelson 法で測定して消費 D-キシロース量を求めた。菌体は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、同緩衝液に懸濁し、3~5 分間 20 kHz で超音波処理により破碎し、これを 12,000 rpm, 20 分間遠心分離し、透明な上澄を粗酵素液とした。D-キシロース脱水素酵素活性は、次の反応組成 (全容 1.0 ml) で測定した。50 mM グリシン・NaOH 緩衝液 (pH 9.8) 0.50 ml, 1 M D-キシロース 0.10 ml, 50 mM NAD 0.05 ml に酵素液と水を添加した。測定は日立 139 型分光光度計を用い、

30°C で NADH の増加を 340 nm で測定した。本条件下において、1 分間に 1 μ モルの NAD を還元するに要する酵素量を 1 単位とし、比活性はたん白 mg 当りの単位数で表わした。

同時に、D-キシロース・イソメラーゼ活性を次の反応組成を用いて測定した。50 mM グリシン・NaOH 緩衝液 (pH 9.3) 0.50 ml, 10 mM MnCl_2 0.05 ml, 100 mM D-キシロース 0.05 ml に酵素液と水を加えて全容を 1.0 ml とした。反応は 35°C で 10 分間行ない、10% トリクロル酢酸 0.1 ml を添加して反応を停止させ、生成したキシロースをシステイン・カルバゾール硫酸法で測定した。本酵素 1 単位は、上記条件下で 1 分間に 1 μ モルのケトペントースを生成するに要する酵素量とした。たん白質は 280, 260 nm の吸光度より求めた。

3. 反応生成物の同定法 D-キシロースからの反応生成物を D-キシロン酸と想定し、D-キシロン酸を Kili-ani の方法⁽³³⁾に従って D-キシロースをブロム酸化して、Ba 塩としてエタノール沈殿法で得た。本品を大西博士より提供いただいた D-キシロン酸 Ba と下記の方法で比較した結果、全く同一であったので、これを標準品とした。反応生成物の同定のために、ペーパークロマト法および赤外線吸収スペクトルについて標準品と比較した。ペーパークロマト法は、展開溶媒を *n*-ブタノール:ギ酸:水 (10:2:15) とし、展開後有機酸を BPB, 糖をアンモニア性硝酸銀で発色して検出した。反応液より得た Ba 沈殿は、赤外吸収スペクトルを Nujol 法で測定した。

実験結果

1. D-キシロース脱水素酵素生産菌の分離

D-キシロース資化性細菌 150 株および研究室保存菌株 50 株のうち、特に D-キシロースによく生育する菌株 40 株 (分離株 32 株, 保存菌株 8 株) を選び出し、これらの D-キシロース資化性、D-キシロースの酸化能を検討した。保存菌株 8 株は、*Escherichia* 4 株, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* 各 1 株であった。以上の菌株中 39 株は、D-キシロース・イソメラーゼを生産し、酸化能は全く検出できなかった。しかし、分離菌 No. 588 株が強力に D-キシロースを酸化し、同時に弱い D-キシロース・イソメラーゼをも生産することを見出した。本菌の粗抽出液による D-キシロースの酸化能を、NAD の還元反応で反応経過により Fig. 1 に

Fig. 1. Reduction of NAD with D-Xylose by Crude Extract.

Reaction was started with the addition of crude extract in the standard assay mixture (1.0 ml) at 30°C, and the reaction was recorded with a model 24 Gilford recording spectrophotometer.

Fig. 2. Photomicrograph of the Isolated Bacterium, No. 588.

Bar denotes 1 μ m.

示した。

2. 分離菌 No. 588 菌の菌学的特徴

No. 588 菌の形態的特徴および生理試験の結果を Table I にまとめた。本菌を 18 時間培養したときの電子顕微鏡写真を Fig. 2 に示す。その結果、本菌は Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 第 7 版 (1957) の記載に準じて分類すると, *Arthrobacter* 属に属するものと判定した。特に *Arthrobacter simplex* とは、運動性、色素生産性 (－), リトマスミルク凝固性 (－), 硝酸塩の還元 (+), デンブンの分解性 (－), 生育温度等がよく一致したが、ゼラチンの液化、硫化水素の生成、ウレアーゼの生成では一致しなかった。また, *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter urea-faciens* とは一致しない項目が、さらに多くなった。以上の結果, No. 588 菌は *Arthrobacter simplex* に近似しているが、新菌種として設定することが適当であると判断し, *Arthrobacter* sp. No. 588 と命名した。

Table I. Microbial Characteristics of the Isolate, Strain No. 588

1. Morphological characteristics	
Short rod 0.3 to 0.7 by 1.0 to 2.0 μ m, occurring mostly singly, or in coccoid. Pleomorphic, curved and irregularly formed cells appear with aging.	
Motility: Mostly non-motile, some are motile with single polar flagellum.	
Spore formation: negative	
Gram-stain: negative	
Acid-fastness: negative	
2. Cultural characteristics	
Nutrient agar colonies: circular, translucent, creamy white, convex, smooth	
Nutrient broth	
Growth: moderate, turbid and sediment	
Turbidity: uniform	
Surface growth: scanty, formation of a ring; poor, no gas, pigment or fluorescence	
Anaerobic growth: negative, no liquefaction of gelatine (60 days culture)	
Litmus milk: no coagulation, reduction of litmus reluctant	
3. Physiological characteristics	
Obligate aerobic	
Optimum temperature for growth: 10° to 37°C	
pH for growth: pH 6~9, maximum at pH 7	
Denitrification: positive without gas	
Reduction of nitrate to nitrite: positive	
Indole production: negative	
Hydrolysis of starch: negative	
Hydrolysis of cellulose: negative	
H ₂ S production: negative	
Voges-Proskauer test: negative	
Methyl red test: negative	
Assimilation of citrate: positive	
Water-soluble pigment production: negative	
Urease: positive	
Oxidase: negative	
Catalase: positive	
O-F test: fermentative	
Acid production (but no gas): D-arabinose, poorly	
No acid and no gas production: xylose, glucose, mannose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, trehalose, sorbitol, mannitol, inositol, glycerol, starch	

3. D-キシロース脱水素酵素の生産に及ぼす影響

Fig. 1 に示したように、本菌の D-キシロース生育菌体より得られる粗抽出液は D-キシロースを基質としたとき、顕著な NAD の還元がみられたので、この活性を D-キシロース脱水素酵素として本酵素の培養による生

Fig. 3. Effect of Concentration of Ammonium Sulfate on D-Xylose Dehydrogenase Production.

○ D-xylose dehydrogenase, ● D-xylose isomerase, △ protein in extract, ▲ pH of medium.

Table II. Effect of Nitrogen Source on D-Xylose Dehydrogenase Production

Nitrogen source (0.25%)	Bacterial growth		Protein (mg)	D-Xylose dehydrogenase (units)	D-Xylose isomerase (units)
	A_{600nm} (1:10 dilution)	pH			
$(NH_4)_2SO_4$	0.112	6.69	26.1	22.35	3.24
NH_4Cl	0.125	6.58	29.4	21.27	1.94
$NH_4H_2PO_4$	0.211	6.53	48.1	30.72	7.40
$(NH_4)_2HPO_4$	0.110	6.70	21.6	16.20	3.26
$NaNO_3$	0.071	7.10	16.0	9.57	1.63
KNO_3	0.066	6.90	8.6	10.19	2.52
L-Asparagine	0.135	7.75	28.7	9.45	2.73
Urea	0.145	7.98	38.3	29.08	6.41
Casamino acids	0.288	6.88	51.5	17.73	5.88
Peptone	0.085	6.91	15.4	5.92	2.38

Culture was made in 100 ml medium at 30°C for 20 hr with respective nitrogen compound as nitrogen source. Addition of $FeSO_4$ in media was omitted.

Table III. Induction of D-Xylose Dehydrogenase and D-Xylose Isomerase by Various Sugars and Sugar Alcohols

Carbon source (1%)	Bacterial growth		Protein (mg)	D-Xylose dehydrogenase (units)	D-Xylose isomerase (units)
	A_{600nm} (1:10 dilution)	pH			
D-Xylose	0.272	5.98	85.5	63.2	3.4
D-Arabinose	0.158	6.37	31.8	1.8	0.2
L-Arabinose	0.215	6.04	88.8	2.5	0.7
D-Ribose	0.045	6.64	8.0	0.2	0.0
D-Glucose	0.267	6.12	48.2	0.5	0.1
D-Galactose	0.250	5.97	103.6	1.6	0.3
D-Fructose	0.266	5.99	82.2	0.4	0.0
D-Mannose	0.197	5.81	132.2	0.4	0.3
Sucrose	0.304	5.78	103.2	0.7	0.2
D-Mannitol	0.288	5.80	123.2	0.4	0.2
D-Sorbitol	0.212	6.30	49.6	0.0	0.0

Fig. 4. Effect of Concentration of D-Xylose on D-Xylose Dehydrogenase Production.

See the legend in Fig. 3.

産条件について検討した。特に本菌においては、D-キシロース脱水素酵素活性のほか、D-キシロース・イソメラーゼ活性も認められたので、両活性の異同を明らかにするため、両活性の生産の変動を追跡した。

a. 窒素源：各種窒素源を 0.25% とし、培地各 100ml に 30°C, 20 時間振盪培養し、粗抽出液について両酵素活性およびたん白量を測定した (Table II)。本菌の生育には、アンモニウム塩および有機窒素源としてアスパラギン、尿素、カザミノ酸がよく、酵素の生産には尿素、 $NH_4H_2PO_4$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl 等が有効で、硝酸塩、ペプトンは生育、酵素の生産ともに有効ではなかった。イソメラーゼの生産も大体同様であった。硫酸を窒素源として、その最適濃度を 0.25% とした (Fig. 3)。

b. 炭素源：各種糖、および糖アルコールを用いて炭素源の影響について検討した (Table III)。本菌は D-キシロース資化性菌として分離されたが、D-リボース以外の用いた 10 種の糖、糖アルコールによく生育した。しかし D-キシロース脱水素酵素活性は、D-キシロース生育菌にのみ強く見出され、D-、L-アラビノース、D-ガラクトース生育菌に弱い活性が見られたにすぎない。以上の結果より、本脱水素酵素は D-キシロースにより誘導的に生成される酵素である。一方、D-キシロース・イソメラーゼも D-キシロースにより特異的に誘導された。D-キシロースの有効濃度は、18 時間培養では 0.5% が最高で、そ

Table IV. Effect of Salts on D-Xylose Dehydrogenase Production

Salt (0.01%)	Bacterial growth		Protein (mg)	D-Xylose dehydro- genase (units)	D-Xylose isomerase (units)
	A_{500nm} (1:10 dilution)	pH			
None	0.068	6.70	27.0	2.60	1.44
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.161	6.60	28.8	8.81	1.62
MgSO ₄ ·7H ₂ O+NaCl	0.157	6.61	42.0	9.90	2.86
" +CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.158	6.65	35.9	5.00	2.01
" +MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.221	6.23	58.2	10.96	9.85
" +ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.159	6.70	48.1	5.02	4.49
" +FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.224	6.28	97.7	50.93	7.09

See the legend to Table II and text.

Fig. 5. Effect of Concentration of MgSO₄ on D-Xylose Dehydrogenase Production.

れ以上の高濃度では酵素の生産量がやや減少した (Fig. 4). 以後の実験は, すべて D-キシロースを 0.5% とした培地を用いた.

c. 金属塩: FeSO₄ を含まない培地で, 菌の生育および酵素の生産に及ぼす金属塩について検討した (Table IV). 本菌の生育には MgSO₄ の添加が必要であり, MgSO₄ の必要濃度は 0.005% で最高に達し, 0.01% 以上では菌の生育, 脱水素酵素の生産量ともにほとんど変化が認められない (Fig. 5). MgSO₄ 0.01% 添加培地に各種金属塩を添加すると, Na⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ 塩の添加は菌の生育に有効であったが, 脱水素酵素の生産には影響が認められなかった. しかし, FeSO₄ の添加により, 脱水素酵素の生産は約 5.8 倍に増加した. この FeSO₄ の効果はイソメラーゼの生産についても認められたが, イソメラーゼの生産には, MnSO₄ の添加が最も有効であった.

d. 始発 pH: 本菌は pH 5.0 以下および pH 10.0 以上では生育せず, pH 6~9 の間でよく生育し, 生育の

至適 pH は 7 付近であった. 酵素生産のための至適始発 pH は 7.0~7.5 で, 生育度とほとんど一致した. 他方, イソメラーゼの生産の至適始発 pH は 8.0 で, 若干のズレが認められた (Table V).

e. 培養時間: 上記の検討結果に従い, 前記の組成の培地を用いて, 培養時間を 12~36

時間について, 菌の生育度と酵素の生産量との関係を検討した (Fig. 6). 脱水素酵素の生産は培養 16 時間で最高に達し, 以後漸減した. この傾向は, イソメラーゼの生産とは明らかに異なっていた.

f. 培地液量: 500 ml の三角フラスコに培地を 50, 100, 150 および 200 ml ずつ添加し, 30°C, 16 時間培養して好気条件の影響を検討した (Fig. 7). 脱水素酵素の生産は 100 ml までの好気条件がよく, 培地液量がさらにふえると, 酵素の生産は激減した. しかし, 本菌のイソメラーゼの生産は好氣的ではなく, 両酵素の生産の様

Table V. Effect of Initial pH on D-Xylose Dehydrogenase Production

Initial pH	Bacterial growth		Protein (mg)	D-Xylose dehydro- genase (units)	D-Xylose isomerase (units)
	A_{500nm} (1:10 dilution)	pH			
5.5	0.068	4.98	5.1	3.63	0.11
6.5	0.265	5.40	80.3	46.95	3.16
7.0	0.259	6.20	99.2	64.79	4.16
7.5	0.252	6.57	100.5	62.70	4.82
8.0	0.247	6.72	104.3	57.88	7.92
9.0	0.247	6.90	94.7	52.35	6.24

See the legend in Table II. FeSO₄ (0.01%) was added in media.

Fig. 6. Time Course of D-Xylose Dehydrogenase Production.

Fig. 7. Effect of Volume of Medium on D-Xylose Dehydrogenase Production.

△ D-Xylose dehydrogenase produced per 50 ml of medium.

式は明確に異なっていた。

4. 反応生成物の同定

本酵素を精製し検討した結果*, 本反応の至適 pH は 10.4 であり, pH 8 以下では活性がなく, 同時に添加した乳酸脱水素酵素あるいはアルコール脱水素酵素を用いて NAD を介する共転反応が進行せず, 反応生成物を蓄積することができなかった。酵素反応液を直接濃縮し, ペーパークロマト法で反応生成物を検出した。その結果, BPB 発色法で R_f 値 0.14~0.15 のスポットが検出され, 標準キシロン酸の 0.13~0.15 の値と一致した。

Fig. 8. Infrared Spectrum of the Reaction Product of D-Xylose Dehydrogenase.

A: standard D-xylonate (Ba salt), B: reaction product (Ba salt).

* 山中 啓, 金田隆一: 未発表。

Fig. 8 に, 反応生成物の Ba 塩および D-キシロン酸 Ba の赤外吸収スペクトルを示す。以上の結果, D-キシロース脱水素酵素の反応生成物を D-キシロン酸と同定した。従って, 本酵素の最初の生成物は, D-キシロン酸-γ-ラクトンであろうと推定した。

考 察

微生物による D-キシロースより D-キシロン酸の生成については, 細菌, かび, 酵母, すなわち *Penicillium* sp.⁽²³⁾, *Fusarium lini*⁽²⁴⁾, *Penicillium corylophilum*⁽²⁵⁾, *Pullularia* sp.⁽²⁶⁾, *Pichia quercibus*⁽²⁷⁾, *Pseudomonas* sp.^(28,29), *Acetobacter* sp.⁽³⁰⁾, *Micrococcus* sp.⁽³¹⁾ 等について広く見出されている。しかし, この反応に関与する酵素に関する報告はほとんどなく, わずかに *Trametes versicolor* や *Phellinus igniarius* に D-キシロース酸化酵素の存在が予測されたにとどまる⁽³²⁾。本酵素はフラビン酵素であり, 反応は酸素吸収を伴うなど, 本報の *Arthrobacter* sp. No. 588 の脱水素酵素とは明らかに相違する。他方, *Polyporus obtusus* の carbohydrate oxidase は基質特異性が低く, D-グルコース, D-キシロース, L-ソルボース等に作用し, 反応生成物はそれぞれのオゾンである^(33,34)。さらに, *Pseudomonas* 属細菌より得られるアルドース脱水素酵素 (NAD) は基質特異性が低く, D-ガラクトース, L-アラビノースのほか, D-グルコース, D-キシロースにも同様に作用する⁽³⁵⁾。また, パン酵母の L-キシロース脱水素酵素 (NADP) も基質特異性が低く, L-キシロースのほか D-アラビノース, L-リキソースに作用した⁽³⁶⁾。しかるに, 本報の *Arthrobacter* sp. No. 588 の生産する脱水素酵素は NAD を要求し, 基質特異性が高く D-キシロースにのみ作用し, 既報のいずれの酵素とも異なる新酵素と考えられる。本脱水素酵素の反応生成物はキシロン酸と同定されたので, その反応式を次式のごとく推定した。

要 約

1. 土壌より D-キシロース酸化能を有する細菌を分離し, *Arthrobacter* sp. No. 588 と同定した。

2. D-キシロースの酸化生成物をキシロン酸と同一し、本酵素を新しく D-キシロース脱水素酵素と命名した。

3. 培養による本酵素生産の至適条件は、次のとおりであった。窒素源として尿素, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl 等が、炭素源として D-キシロースが有効であった。FeSO₄ の添加は、酵素の生産を著しく促進した。

D-キシロン酸 Ba を分譲いただいた鹿児島大学農学部教授大西博博士、および野田産業科学研究所鈴木敏之氏に厚くお礼を申し上げる。

- (1) I. C. Gunsalus, B. L. Horecker and W. A. Wood : *Bacteriol. Rev.*, **19**, 79 (1955).
- (2) R. P. Mortlock, D. D. Fossitt and W. A. Wood : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **54**, 572 (1965).
- (3) M. Tomoeda and H. Horitsu : *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 139 (1964).
- (4) H. Horitsu, I. Sasaki and M. Tomoeda : *ibid.*, **34**, 676 (1970).
- (5) C. Chiang and S. G. Knight : *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 454 (1959).
- (6) *idem* : *ibid.*, **46**, 271 (1961).
- (7) V. Moret and S. Sperti : *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 124 (1962).
- (8) C. Shu-cheng, L. Kao-hsiang and W. Huei-lian : *Acta Biochem. Biophys. Sinica*, **2**, 237 (1962).
- (9) C. Shu-cheng and L. Kao-hsiang : *ibid.*, **3**, 484 (1963).
- (10) M. Chakravorty, L. A. Veiga, M. Bacila and B. L. Horecker : *J. Biol. Chem.*, **237**, 1014 (1963).
- (11) B. M. Scher and B. L. Horecker : *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 117 (1966).
- (12) H. Horitsu, M. Tomoeda and K. Kumagai : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 514 (1968).
- (13) L. A. Veiga, M. Bacila and B. L. Horecker : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2**, 440 (1960).
- (14) L. A. Veiga : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **14**, 65 (1968).
- (15) *idem* : *ibid.*, **14**, 79 (1968).
- (16) A. S. Dahms and R. L. Anderson : *J. Biol. Chem.*, **247**, 2222 (1972).
- (17) *idem* : *ibid.*, **247**, 2228 (1972).
- (18) A. S. L. Hu and A. L. Cline : *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 237 (1964).
- (19) A. L. Cline and A. S. L. Hu : *J. Biol. Chem.*, **240**, 4488 (1965).
- (20) H. Schachter, J. Sarney, E. J. McGuire and S. Roseman : *ibid.*, **244**, 4785 (1969).
- (21) P. W. Mobley, R. P. Metzger and A. N. Wick : *Arch. Biochem. Biophys.*, **139**, 83 (1970).
- (22) A. G. Maijub, M. A. Pecht, G. R. Miller and W. R. Carper : *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 37 (1973).
- (23) A. Angeletti and C. F. Cerutti : *Ann. Chim. Appl.*, **21**, 491 (1931).
- (24) A. Hayashida : *Biochem. Z.*, **298**, 169 (1938).
- (25) 池田俊一, 山田浩一 : 農化, **37**, 514 (1963).
- (26) H. Kiessling, B. Lindberg and J. McKay : *Acta Chem. Scand.*, **16**, 1858 (1962).
- (27) T. Suzuki and H. Onishi : *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1233 (1967).
- (28) L. B. Lockwood and G. E. Nelson : *J. Bacteriol.*, **52**, 581 (1946).
- (29) R. Weimberg : *J. Biol. Chem.*, **236**, 629 (1961).
- (30) K. Bernhauer and E. Riedl-Tűmová : *Biochem. Z.*, **321**, 26 (1950).
- (31) M. Ohsugi, T. Tochikura and K. Ogata : *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 357 (1970).
- (32) H. Lyr : *Enzymologia*, **24**, 69 (1962).
- (33) H. W. Ruelius, R. M. Kerwin and F. W. Janssen : *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 493 (1968).
- (34) F. W. Janssen and H. W. Ruelius : *ibid.*, **167**, 501 (1968).
- (35) A. L. Cline and A. S. L. Hu : *J. Biol. Chem.*, **240**, 4493 (1965).
- (36) K. Uehara and M. Takeda : *J. Biochem.*, **52**, 461 (1962).