[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.69, No.10, pp.1341~1347, 1995]

Bacillus subtilis の生育改善変異株によるアデノシン生産

西山 徹*, 唐沢昌彦*, 山本晃隆*, 一海忠俊

横関健三, 中松 亘*

(味の素(株)東海工場, *現, 味の素(株)中央研究所)

平成 7 年 4 月 25 日 受理

Production of Adenosine by a Growth-improved Mutant of *Bacillus subtilis* (Industrial Production of Adenosine, Part III)

Toru NISHIYAMA, Masahiko KARASAWA, Khoryu YAMAMOTO, Tadatoshi IKKAI,
Kenzo YOKOZEKI, and Tsuyoshi NAKAMATSU

Engineering Department, Tokai Plant, Ajinomoto Co., Inc., Yokkaichi, Mie 510

In the course of adenosine production by *Bacillus subtilis* No.43-35, xanthine non-requiring revertants appeared frequently in the late phase of main culture. Adenosine productivities of the isolated revertants were extremely decreased. The appearance of the revertants was not affected by the times of cell duplication, but by the change of medium conditions accompanying cell growth.

The growth of *Bacillus subtilis* No.43-35 in a minimal medium was inhibited by the addition of L-leucine and L-serine. A mutant in which growth was not inhibited by L-leucine and L-serine was isolated from No.43-35. The mutant, No.11-7, thus obtained, showed higher adenosine productivity than the parent strain, No.43-35. In addition, the xanthine non-requiring revertants did not appear through the fermentation by No.11-7.

Strain No.11-7 produced 30 g/l adenosine from 130 g/l glucose in a glass jar fermentor with a working volume of 300 ml under the best cultural conditions found.

(Received April 25, 1995)

緒 言

近年, 抗ウイルス剤としての非天然系ヌクレオシドの有効性が注目されている。抗ヘルペスウイルス剤として開発され, 1984 年に認可されたビダラビン (アデニンアラビノシド), 抗エイズ薬としてのアジドチミンやジデオキシイノシン (DDI) 等がその例としてあげられる。ビダラビンはウリジンとアデニンを原料として化学合成と酵素反応の組み合わせにより製造されている⁽¹⁾。DDI は, アデノシンを原料として DDA (ジデオキシアデノシン) を合成したのち, 酵素反応で脱ア

ミノ化することにより製造されている^(2,3)。これら核酸系医薬の原料となるアデノシンの安価で大量な生産方法の確立が強く望まれていた。アデノシン生産菌の育種に関しては羽田らの報告^(4,7,8)があるがキサンチン要求性の復帰頻度が高く, アデノシンの蓄積が極めて不安定という問題点があった。このような背景の下, 我々は発酵法によるアデノシンの工業的製造法の確立を目指し研究を開始した。*Bacillus subtilis* のイノシン生産菌から本菌の有するアデニン要求性を復帰させた変異株を採取し, これに 2-チオアデニンサルフェイト, 8-アザアデニン, 6-メチルアミノプリン各プリンのアナログ耐性を付与することによりアデノシン生産菌を育種した^(5,6)。更にこの菌株を用いて工業的なアデノシン

*アデノシン発酵の工業的確立 (第 3 報)

生産の基礎的検討を開始した。本菌株のアデノシン蓄積は比較的安定であったが、培養後期にキサンチン要求の復帰変異株が出現するという性質も有していた。工業的生産においては、蓄積安定性、発酵管理等の観点から当然復帰変異の無い菌株の使用が望まれる。そこでキサンチン要求が復帰せず、アデノシン生産能の高い変異株の採取を目指して検討を行った。その結果、アデノシンの生成速度、収率、蓄積のいずれもが向上しており、しかも、キサンチン要求の復帰変異株が出現しない変異株を育種する事ができた。本報では、これらの検討結果を報告する。

実験方法

1. 使用菌株

前報⁽⁶⁾で報告したアデノシン生産菌 *Bacillus subtilis* No.43-35 を親株とし、生育改善変異株を誘導した。

2. 変異操作

変異剤として N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) を使用し、変異株の誘導は、NTG 500 $\mu\text{g/ml}$, 0°C, 30 分の処理条件で行った。

3. 培地・培養条件

培地は、以下の 4 種類の培地を用いた。

培地 1 (最少培地): グルコース 20.0 g, NH_4Cl 5.0 g, L-グルタミン酸 1.0 g, クエン酸ナトリウム 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, グアニン 0.1 g を蒸留水で 1 l に調製 (pH 7.0, 115°C, 10 分殺菌) した。

固体培地を調製する際には、上記培地に寒天を 20 g/l になるように添加した。

培地 2 (リフレッシュ用培地): 酵母エキス 5 g, ポリペプトン 5 g, 可溶性澱粉 30 g を蒸留水で 1 l に調製 (pH 7.0, 115°C, 15 分殺菌) した。固体培地を調製する際には、上記培地に寒天を 20 g/l になるように添加した。

培地 3 (種培地): グルコース 30.0 g, NH_4Cl 5.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 大豆蛋白加水分解液 (総窒素 30 g/l) 40 ml, 尿素 2.0 g, グアニン 0.06 g, 酵母エキス 0.5 g, アデカノール (消泡剤) 0.05 ml を蒸留水で 1 l に調製 (pH 6.5, 115°C, 5 分殺菌) した。

培地 4 (生産培地): グルコース 80.0 g, NH_4Cl 15.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

O 0.01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, KCl 2.0 g, グアニシンの塩酸処理物 (グアニシン 12.5 g/1 N HCl 1 l, 100°C, 60 分処理) 0.8 ml, 大豆蛋白加水分解液 (総窒素 30 g/l) 20 ml, アデカノール (消泡剤) 0.5 ml を蒸留水で 1 l に調製 (pH 7.0, 115°C, 15 分殺菌) した。これに中和剤として、別殺菌した CaCO_3 を 25 g/l となるように培養前に添加した。

培養は、試験管 (3 ml/20 ml 試験管), 坂口フラスコ (20 ml/500 ml フラスコ) 及び小型ガラスジャーフェーマンター (300 ml/1,000 ml ジャーフェーマンター) で行った。

試験管, フラスコ培養の場合は、培地 2 で 34°C, 16 時間培養した菌を試験管もしくは坂口フラスコに 1 白金耳接種し, 34°C, 72~96 時間, 振とう培養した。

小型ガラスジャーフェーマンターで培養する場合は、培地 3 (坂口フラスコ) で 24 時間培養後, 培養液 15 ml を培地 4 を含むガラスジャーフェーマンターに接種し, 通気量 150 ml/min, 攪拌数 700 rpm, pH 6.5 (アンモニアガス) 制御の条件で培養を行った。

4. アデノシン定量分析

培養液中のアデノシンの定量分析は、前報⁽⁶⁾と同様に液体クロマト法で行った。

実験結果

1. *Bacillus subtilis* No. 43-35 のキサンチン要求の復帰頻度とこれに与える培地成分の影響

羽田らの報告^(4,7,8)による *Bacillus subtilis* の変異株を用いたアデノシン発酵においては、キサンチン要求の復帰変異株の出現に起因するアデノシン蓄積の不安定性が大きな問題となっていた⁽⁴⁾。我々の育種したアデノシン高蓄積株, *Bacillus subtilis* No.43-35⁽⁶⁾ のアデノシン生産性は比較的安定していたが、この株におけるキサンチン要求の復帰の有無を、小型ガラスジャーフェーマンター (300 ml 張り込み) を用いて検討した。

結果を Table I に示したが、本菌においても頻度は低いものの、培養後期の 70 時間目から復帰変異株の出現が認められ、培養終了時点の 90 時間目での復帰変異株の出現頻度は 4.3%であった。この実験で得られた復帰変異株について、試験管培養でアデノシン生産性を調べた結果、キサンチン要求の復帰した変異株のアデノシン蓄積能は大幅に低下していた (Table II)。復帰変異株の出現が培養後期にあるので、上記条件ではア

Table I Frequency of the Appearance of Xanthine Non-requiring Revertants in the Main Culture Broth.

Culture time(h)	Viable cells ($\times 10^7$)		
	A	B	(B/A) $\times 100$
42	380	0	0
70	320	1	0.3
90	230	10	4.3

The strain No.43-35 was cultured in a small scale jar fermentor containing 300 ml of medium 4.

The number of total viable cells (A) and xanthine non-requiring revertants (B) were calculated at 42, 70, 90 h-cultivation.

Table II Adenosine Production by Xanthine Non-requiring Revertants

Strains	Optical density ^{*2)}	Residual sugar (g/l)	Adenosine accumulated (g/l)
No.43-35	0.55	19.0	7.5
Revertants ^{*1)}	0.70	14.5	0.8

No.43-35, and 14 strains of xanthin non-requiring revertants were cultured at 34°C for 72 h in test tube containing 3 ml of medium 5

^{*1)} The figures of OD, RS, and adenosine were the average values of 14 revertants.

^{*2)} Optical density was measured at 562 nm after 52-fold dilution.

デノシン蓄積に大きな影響を与えないものと考えられる。しかし、これら復帰変異株の糖消費速度および生育はNo.43-35株よりも速いため、この復帰変異株が細胞分裂に比例して出現するならば、より多くの植菌段数を要する工業規模の生産では、復帰変異株の出現が早まり、この結果アデノシン生産が不安定になる可能性が考えられる。一方、復帰変異株の出現が分裂回数に比例せず、増殖に伴う培地成分、培養pH等の培養環境の変化によって誘導される可能性も考えられる。そこで、復帰変異株の出現が上記のどちらによるものかを調べるため、小型ジャーファーマンターによる培養(スラント→20 ml 張り込みフラスコ→300 ml 張り込み小型ジャーファーマンター)と、これよりも多くの分裂回数を要する60 kl 張り込みの大型タンクでの培養(スラント→20 ml 張り込みフラスコ→300 ml 張り込み小型ジャーファーマンター→3 kl 張り込み中型タンク→60 kl 張り込み大型タンク)の2つのスケールでの培養にお

Table III The Influence of Culture Scale on The Appearance of Xanthine Non-requiring Revertants during the Main Culture of Adenosine Fermentation

Fermentor (volume) ^{*1)}	Revertants (%) ^{*2)}			
	24 h	48 h	72 h	90 h
300 ml	0.0	0.0	0.11	3.28
300 ml	0.0	0.0	0.0	0.0
60 kl	0.0	0.0	0.01	0.14
60 kl	0.0	0.0	0.02	1.51

^{*1)} : working volume

^{*2)} : percentage of xanthine non-requiring revertants on total viable cells at the designated culture time.

ける復帰変異株の出現をまず比較した。この結果、Table IIIに示すように、いずれの場合も本培養70時間目以降に復帰変異株が出現し、その頻度は培養終了(90時間目)時においてそれぞれ3.3% (小型ジャーファーマンター)、1.5% (大型タンク)とほとんど差がなく、またアデノシン蓄積も同等であった。この事は、キサンチン要求の復帰変異が分裂回数に比例して起きるのではなく、増殖に伴う培養環境の変化によるものである事を強く示唆している。

2. キサンチン要求復帰変異の出現に及ぼす培地成分の影響

キサンチン要求復帰変異の出現頻度に影響を及ぼす培地成分を明らかにするため、アデノシン蓄積に大きな影響を及ぼすマグネシウム、リン酸、グアニンに着目し、これらの添加量とキサンチン要求復帰変異株の出現頻度について検討した。この結果、復帰変異株の出現は KH_2PO_4 濃度に比例して増加することが判明した(Fig.1)。 KH_2PO_4 濃度を低くすれば復帰変異株の出現は抑制できたが、アデノシン蓄積も低下してしまい、 KH_2PO_4 濃度を調節することにより復帰変異株出現を抑えることは実用的ではないと判断した。

キサンチン要求の復帰変異株の出現が、培養スケールの違いにかかわらず本培養70時間目以降に起こっていることより、生育速度の改善された変異株が採取できれば、復帰変異株の出現を抑えることができるのではないかと考えた。

3. *Bacillus subtilis* No. 43-35 よりの生育改善変異株の誘導

生育改善変異株誘導の手段として、生育を抑制する

Fig.1 The Effect of KH₂PO₄ on Adenosine Production (○) and Appearance of Xanthine Non-requiring Revertants (●)

アミノ酸を検索し、この生育抑制を解除する変異株の誘導を検討した。アミノ酸生産培地には増殖促進を図るためのアミノ酸混合液（大豆蛋白塩酸加水分解物）を添加しており、このアミノ酸混合液に含まれる生育抑制に関与するアミノ酸の生育抑制を解除できれば、生育が促進される可能性があると考えたからである。そこで、*Bacillus subtilis* No.43-35 を各種アミノ酸を添加した最少培地で培養し、その生育レスポンスを調べた。結果は Table IV に示した。No.43-35 は最少培地に L-ロイシンもしくは L-セリンを単独に添加することにより生育が著しく抑制され、L-ロイシン添加による生育阻害は L-バリンおよびパントテン酸の添加により回復された。このような現象は L-ロイシン、L-バリン生合成系のフィードバック制御機構によるものと考えられる。L-セリンによる生育抑制についての原因は不明である。

そこで、No.43-35 を変異処理し、L-ロイシン及び L-セリンを各 500 mg/l 添加した最少培地での生育株を誘導した。この結果得られた 14 株について、それらの増殖、アデノシン生産能についてフラスコ培養で検討した。この結果、糖消費速度が最も速く、アデノシン蓄積が最も高い菌株として No.11 株が選択できた。更に、この株のモノコロニー分離を行うことにより最優良株として No.11-7 株を選定した。本菌株の各種アミ

Table IV Effects of Amino Acids on the Growth of No.43-35 and No.11-7 in Minimum Medium

Amino acid (2 mM)	No.43-35		No.11-7	
	24 h	45 h	24 h	45 h
none	1.12	1.62	1.07	1.47
L-Asp	1.47	1.62	1.37	1.42
L-Thr	1.27	1.62	1.17	1.57
L-Ser	0.07	0.08	0.19	1.42
L-Glu	1.42	1.67	1.22	1.47
L-Pro	1.27	1.57	0.97	1.22
L-Gly	1.42	1.57	1.22	1.42
L-Ala	1.17	1.57	0.99	1.47
L-Val	1.07	1.47	1.17	1.37
L-Met	1.52	1.57	1.37	1.57
L-Ile	0.87	1.57	1.07	1.57
L-Leu	0.06	0.21	0.36	1.37
L-Tyr	1.42	1.57	1.37	1.47
L-Phe	1.42	1.62	1.27	1.42
L-Lys	1.42	1.62	1.07	1.57
L-His	1.42	1.57	0.89	1.57
L-Arg	1.42	1.62	1.27	1.37
L-Trp	1.37	1.67	1.17	1.47

No.43-35 and No.11-7 were cultured in a minimum medium with the designated amino acids and the growth was measured at 570 nm at 24 h and 45 h cultivation

ノ酸に対する生育レスポンスを調べた結果を Table IV に示した。予想どおり No.11-7 株においては L-ロイシン、L-セリンによる生育抑制が解除されていた。

4. *Bacillus subtilis* No. 11-7 によるアデノシン生産

大型タンクを用いた工業的規模での生産においては、小型ガラスジャーとは異なり、酸素分圧を効率よく高めるためと雑菌汚染防除のために通常内圧をかけて培

Table V Effect of Inner Pressure or Oxygen Concentration of Inlet Air on Adenosine Production

Culture Conditions			
Inner pressure (kg/cm ²)	Oxygen in inlet air (%)	Adenosine yield (%)	Glucose consumption rate (g/l·h)
0.0	21	17.3	2.26
0.4	21	12.7	1.61
0.0	30	13.2	2.01

No.11-7 was cultured in jar-fermentor containing 3 l of medium 5 under the designated culture conditions. Other experimental conditions were the same as described in "Materials and Methods"

Fig.2 The Effect of Glucose Consumption Rate on Adenosine Production

養する。そこで小型ジャーファーマンターを用いて強制的に内圧をかけた条件下での No.11-7 株によるアデノシン生産の検討を行った。結果を Table V に示したが、内圧 (0.4 kg/cm^2) をかける事により糖の消費速度、アデノシン収率が大きく低下することが判明した。この現象が圧力そのものの影響によるものなのか、あるいは酸素分圧が高まったことによる酸素供給の影響によるものかを確認するため、内圧 0 かつ酸素分圧を高めた条件でアデノシン生産の検討を行った。この結果、この条件でも内圧をかけた場合と同様の傾向が観察された。No.11-7 株の種々の培養結果を糖消費速度とアデノシン生成収率の関係で整理してみた。その結果を Fig.2 に示す。糖消費速度とアデノシン生成収率の間に正の相関が認められた。

この結果を基にタンク培養での条件検討を行い、内圧を最少にすること、および糖消費速度を制御する等の検討により、内圧 0 と同等の結果が得られ工業的な培養法が確立された。

No.11-7 株及び No.43-35 株について、300 ml 張り込みの小型ジャーファーマンターを用いて培養を行い、その培養経過を Fig.3 に示した。糖消費速度、アデノシン蓄積、収率いずれの点においても No.11-7 が優れており、糖は培養約 70 時間目に完全に消費された。最大酸素消費速度 (maxr_{ao}) を測定したところ、No.43-35 は $9.3 \times 10^{-7} \text{ molO}_2/\text{ml} \cdot \text{min}$ 、No.11-7 は $11.9 \times$

Fig.3 A Typical Time Course of Adenosine Production by No.43-35 (dotted line) and No.11-7 (solid line)

Symbols, —○—, —●— : Adenosine
—△—, —▲— : Residual sugar

$10^{-7} \text{ molO}_2/\text{ml} \cdot \text{min}$ であった。キサンチン要求の復帰変異株の出現頻度を測定したところ、No.43-35 は 0.3% (70 h), 4.5% (90 h) であったのに対し、No.11-7 は培養終了時 (70 h) に復帰変異株が検出されなかった。また No.11-7 の変化した培養特性のひとつに、アデノ

Fig.4 Effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ on Adenosine Production by No.43-35 (●) and No.11-7 (○)

シン蓄積に大きな影響を及ぼすマグネシウムの最適添加量が No.43-45 に比べ 1/5 に減少していた (Fig.4). Mg イオンが多い培地は不溶性の錯塩を生じ、培養の安定性等に悪影響を与える原因となるが、Mg イオンの要求量が低下したことは工業的観点から非常に有利な菌株である。

考 察

アデノシン生産菌の開発に関する研究は過去にいくつか報告されている。それらの菌株が実用化されるにあたっては生産力価の不安定性が課題であり、その原因はキサンチン要求性の復帰変異株の出現とされていた^(4,5)。

アデノシンの発酵生産におけるもう一つの課題として、雑菌汚染に極めて弱いことがあげられる。蓄積されたアデノシンは汚染菌により速やかに脱アミノ化されイノシンに変換される。したがって、復帰変異株が出現すると雑菌汚染との区別がつかなくなり、次の運転バッチへの移行がすぐにはできなくなるという課題が発生する。

アデノシン生産菌の特性として、復帰変異株の出現が必ずある頻度で起こると考えた場合、復帰変異株の方が生育速度が速ければ、工業生産レベルまでスケールアップしたとき大きな問題になる可能性がある。Table II に示すように No.43-35 を培養した時に出現する復帰変異株は糖消費、生育ともに、No.43-35 より速いことが確認された。しかし、復帰変異株の生育速度、糖消費速度がアデノシン生産菌より速いにも関わらず、その出現は培養終了近くでのみ観察された。培養終了時の復帰変異株の出現頻度は培養スケールに関係なく、培養終了時点で 4% 以下であったことから、環境因子の影響によるもので、復帰変異株は細胞分裂回数に比例して出現しているのではないことが示唆された。

キサンチン要求の復帰変異株が培養終了時近くで出現するので、アデノシン生産は基本的には成立する。しかし、工業的観点からは発酵工程管理上の大きな問題が残る。この問題解決の手段としては、アデノシン生産菌にアミノ酸の栄養要求性等のマーカーを付与し、汚染菌と区別することが考えられたが、更に積極的な対策としてアデノシン生産菌の生育速度を改善し、復帰変異株の出現する時間以内に培養を終了させる戦略をたてた。

アデノシン生産培地には生育促進の目的で脱脂大豆の塩酸加水分解物(味液)を添加している。そこで、味液中の主成分である各種アミノ酸の No.43-35 菌の生育に対する影響を検討した。その結果、いずれのアミノ酸においても、単独のアミノ酸添加での生育促進効果は認められなかったが、最少培地に特定のアミノ酸を添加することによって生育阻害が起こる事を見いだした。生育阻害を示すアミノ酸は L-ロイシンと L-セリンであった。L-ロイシンの場合は、L-バリンを添加する事により生育が回復することから L-ロイシン、L-バリン共通代謝系のキー酵素である α -アセトヒドロキシ酸シンセターゼが L-ロイシン添加によりフィードバック阻害を受けるためと考えられる。L-セリン添加により生育抑制が見られた原因は不明であるが、L-セリンはアデノシン生合成の素材の一つであることから、L-セリンによる生育阻害の解除は L-セリンの生合成系の代謝制御の緩和につながり、アデノシン生産には良い影響を与えと考えられた。これらのアミノ酸による生育阻害が解除された菌株を採取し、糖消費速度が速く、アデノシン蓄積が高いという観点から No.11-7 株を選択した。本菌株はアデノシン生産性(収率、速度)が向上するとともにキサンチン要求の復帰変異株は培養終了まで検出されなかった。当然、培養が早く終了する為に復帰変異株が出現しなかったものと考えられるが、No.11-7 は No.43-35 に比して生育速度、糖消費速度が大幅に改善された為、復帰変異株が出現しにくくなったことも加味されていると考えられる。

糖消費速度とアデノシン生成収率の間に相関が認められた (Fig.2)。内圧をかける事により、糖消費速度、アデノシン生成収率ともに低下している。柴井ら⁽⁹⁾ はイノシン発酵における O_2 、 CO_2 分圧の影響について検討している。イノシン発酵では気相の CO_2 分圧が高くなるとイノシン生成は阻害されるが、 CO_2 分圧が高くなっても酸素消費速度 (mole/ml $\cdot$ min) は低下せず、 O_2 分圧が高いと酸素消費速度が低下するというデータが示されている。酸素消費速度と糖消費速度の関連から考えると、イノシン生産菌から育種したアデノシン生産菌においても内圧もしくは O_2 分圧が高いと糖消費速度が低下する現象は同じで、そのことが原因でアデノシン生成が減少すると考えられる。また、内圧の影響と O_2 分圧の影響が同じ程度であることから、アデノシン発酵ではイノシン発酵とは異なり炭酸ガスの影響は

小さいと考える。

要 約

アデノシン生産菌 No.43-35 を用いたアデノシンの発酵生産において、培養後半にキサンチン要求の復帰変異株出現が認められた。復帰変異株のアデノシン蓄積は大きく低下していた。復帰変異株は本培養の後期に出現し、微生物の分裂回数の増加（培養のスケールアップ）とは連動していないと判明した。

最少培地に各種アミノ酸を添加し、No.43-35 の生育レスポンスを検討したところ、L-ロイシンとL-セリンの添加で生育が抑制された。L-ロイシンとL-セリンによる生育抑制が解除された変異株として No.11-7 株を得た。No.11-7 株は親株よりも糖消費速度が速く、アデノシン収率も高い菌株であった。また本菌株はこれまでのアデノシン生産菌と異なり、キサンチン要求性の復帰変異株の出現は検出されなかった。また、アデノシン生産に影響する最適マグネシウム濃度も親株 (No.43-35) の約 1/5 に低下していた。No.11-7 株は 300 ml 張り込み小型ジャーファーマンターの培養で 30

g/l のアデノシンを 70 h で蓄積した。そのときの最大酸素消費速度は $11.9 \times 10^{-7} \text{ mol O}_2 / \text{ml} \cdot \text{min}$ であった。

- (1) T.Utagawa, H.Morisawa, T.Miyoshi, F.Yoshinaga, A.Yamazaki, K.Mitsugi: FEBS Letters, 109, 261—263 (1979).
- (2) 白神 浩, 入江康夫, 岩上寿夫: 日本公開特許公報 02-117689 (May 2, 1990).
- (3) 横関健三, 白江英之, 小林克徳: 日本公開特許公報 02-291291 (Dec.3, 1990).
- (4) K.Haneda, K.Komatsu, R.Kodaira, and S.Ohuchi: Agric. Biol. Chem., 35, 1906-1912 (1971).
- (5) 西山 徹, 中松 亘, 前田 治: 農化, 67, 843—847 (1993).
- (6) 西山 徹, 中松 亘, 白田 輝也: 農化, 68, 809—814 (1994).
- (7) K.Haneda, K.Komatsu, R.Kodaira and H.Ohsawa: Agric. Biol. Chem., 36, 1453—1460 (1972).
- (8) K.Haneda, K.Komatsu, R.Kodaira and H.Ohsawa: Amino Acid and Nucleic Acid, 発酵と代謝, 26, 15—23 (1972).
- (9) H.Shibai, A.Ishizaki, H.Mizuno and Y.Hirase: Agric. Biol. Chem., 37, 91—97 (1972).