

酵母細胞壁溶解酵素生産菌の分離とその同定

山田 哲也・西田 淑男*・久松 眞・赤木 盛郎

三重大学生物資源学部食品化学研究室, *愛知県食品工業技術センター

Study on Yeast Lytic Enzyme from Fungi

Tetsuya YAMADA, Yoshio NISHIDA*, Makoto HISAMATSU
and Morio AKAKI

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Bioresources, Mie University

*Aichi Institute of Food Technology, Nagoya

Abstract

Eighty-two microorganisms lysing a yeast, *Rhodospiridium* sp., were separated from soil by the clear zone method. The media containing polypepton and aspartic acid, as the nitrogen source, and cell wall of *Rhodospiridium* sp. J-5B, as the carbon source, were used for the separation. A strain of *Actinomyces*, No. 39-B was selected from the isolated microbes for its good growth and lytic activity. When the No. 39-B was cultivated in the medium containing 0.5% cell wall of *Rhodospiridium* and 0.05% glucose as the carbon source, it showed high lytic activity (10 units/ml) on hour 48. This enzyme was proven to be an induced type, because no activity was observed in the culture broth when the carbon source was changed from the cell wall to glucose. The crude enzyme was obtained from the culture broth by salting-out with 80% saturation of ammonium sulfate, dialysis, and lyophilization. The enzyme had lytic activities (degree of reduction in OD of living yeast suspension after incubation with 0.3% enzyme for 3 hr at 30°C) for yeasts; 68% to *Rhodospiridium* sp. J-5B, 48% to *Hansenula anomala*, 38% to *Saccharomyces diastaticus*, 8% to *Candida utilis*, and 0% to *Mycotorula japonica* and *Rhodotorula* sp. Z-13. The strain of No. 39-B was estimated to be *Actinomadura spadix* from the data of morphological observation and chemotaxonomical tests showing existence of 2, 6 diamino pimeric acid and madurose.

Key words: yeast, lytic enzyme, Fungi

緒 言

現在主に酵母やかび等に利用されているプロトプラスト化は融合や遺伝子組替え等に必須な技術の一つである。酵母の場合プロトプラスト化の際利用されている細胞壁溶解酵素は数多くの研究がなされているが^{1)~19)}, 実際の研究で最もよく利用されているのは市販のザイモリエ

イス (キリンビール (株))^{1)~5)} である。しかしこの酵素は研究室保存の酵母で生澱粉資化性の *Rhodospiridium* sp. J-5B 株²⁰⁾ に対してはほとんど溶菌性を示さなかった。これは本菌が担子菌類に分類される酵母で、子のう菌類に分類される酵母と比較して、細胞壁構造が異なるためと思われる。そこで本菌のプロトプラストを得ることを目的として、本菌を溶菌する酵素生産菌を自然界から検索し、生産された酵素に関して若干の諸性質を調べた。さらに、検索菌の同定を行うことを目的として、主

に化学的分類法による検討を行ったので報告する。

実験材料及び方法

1. アルカリ処理菌体の調製⁶⁾

Rhodospiridium sp. J-5B 株を YM 培地 (グルコース 1%, 麦芽エキス 0.3%, 酵母エキス 0.5%, ポリペプトン 0.7%) で 30°C, 160 rpm, 5 日間の振とう培養を行い, 菌体を 4000 rpm, 15 分間遠心分離により集菌し, 0.9% 食塩水で 3 回洗浄後, 2 倍容の 3% NaOH に懸濁し, 沸騰浴中で 3 時間処理した。冷却後, 4000 rpm, 15 分間遠心分離により処理菌体を集め, 上澄みの NaOH を除き, 1N HCl で中和後蒸留水で 5 回洗浄した。次に湿菌体重量に対して 5 倍容のエタノールで 5 回洗浄した後, 室温乾燥した。乾燥後, 乳鉢で粉碎し, 200メシュのふるいを通過した菌体粉末をアルカリ処理菌体とした。

2. 溶菌酵素生産菌の分離

溶菌酵素生産菌の分離は Table 1 に示した培地に適度に希釈した土壌懸濁液を入れ, 攪はん後シャーレーで 3~7 日間の平面培養を行い, クリアゾーン法により分離した。分離菌は YM 斜面培地に保存した。

Table 1. Composition of Medium

| | |
|---|-------|
| NaOH-treated cells | 0.1 % |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.1 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.02 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.01 |
| Yeast extract | 0.001 |
| Agar | 2.0 |
| pH | 6.0 |

3. 溶菌酵素の測定法

溶菌酵素の測定法は主として田端ら⁷⁾及び白石ら⁶⁾の方法に従った。すなわち, 前記アルカリ処理菌体 1.5 mg を 0.5 ml の酢酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁し, これに適度に希釈した酵素液ないし, 酵素生産菌培養液 2 ml を加え 30°C, 60 分間往復振とうし反応させ, 反応前後の濁度を 660 nm で測定し濁度減少率 (Lytic Effect %) を求め, 希釈前の原酵素液 2 ml が, 10% の濁度減少を示した場合を 1 Unit とした。

$$\text{Lytic Effect (LE)} = \frac{(d_0 - d_t) - (C_0 - C_t)}{(d_0 - d_E)} \times 100$$

ただし d_0 ; 反応液初発 O.D.

d_t ; 反応液 60 分後の O.D.

d_E ; 菌体懸濁液の代わりに水を用いたときの O.D.

C_0 ; 酵素液の代わりに水を加えたときの対照の初発 O.D.

C_t ; C_0 の 60 分後の O.D.

なお, アルカリ処理菌体を基質とした場合 $C_0 - C_t = 0$ となるため $C_0 - C_t$ は無視した。 d_E は供試菌や培養条件によっては無視できない場合があった。また, LE は 50% 以下になるように酵素液を希釈した。

4. 培養条件の検討

Table 2 に示した A, B, C 3 種の培地それぞれ 30 ml を 100 ml 容三角フラスコに分注し, 常法通り殺菌, 冷却後, 供試菌の一金耳を接種し 30°C, 4 日間, 160 rpm の振とう培養を行った。培養後, 遠心分離 (4000 rpm, 15 分間) により菌体を回収し, 上澄みの溶菌酵素活性を測定した。なお酵素活性測定は 24 時間ごとに経時的に行った。また, 初発 pH の影響は 1N HCl および 1N NaOH により pH を調整した B 培地 30 ml において

Table 2. Composition of Medium

| | |
|--------------------------------------|-------|
| A-medium | |
| NaOH-treated cells | 0.5 % |
| Poly pepton | 0.1 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.02 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.01 |
| Yeast extract | 0.01 |
| pH | 6.5 |
| B-medium | |
| NaOH-treated cells | 0.5 % |
| Asp | 0.1 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.05 |
| pH | 7.0 |
| C-medium | |
| NaOH-treated cells | 0.5 % |
| Poly pepton | 0.1 |
| Malt extract | 0.1 |
| pH | 6.5 |

同様に検討した。さらに、B培地 (pH 6.0) 30 ml にグルコース0.05%, 0.1%, 0.3%およびアルカリ処理菌体をグルコースに換え、溶菌酵素生産に対するグルコースの影響を検討した。

5. 溶菌酵素の調製および性質

放線菌 39-B 株を供試菌株として培地 (アルカリ処理菌体0.5%, グルコース0.05%, アスパラギン酸0.1%, K_2HPO_4 0.05%, pH 6.0) 150 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注し、常法通り殺菌、冷却後、同様の培地で2日間前培養した培養液 2 ml を接種し、28°C, 200 rpm の振とう培養を行った。培養後、遠心分離により菌体を回収し、上澄みに対し80%飽和の硫酸塩析を行った。次に沈澱物を遠心分離により集め、純水に溶解後、一夜流水中で透析を行い、不純物除去後、凍結乾燥し溶菌酵素標品を得た。

本酵素の至適 pH は、0.1M McIlvaine 緩衝液 (pH 3~pH 8) を用い、0.5 mg/ml の粗酵素液として3.の活性測定法により検討した。

各種酵母生細胞に対する溶菌性は当研究室の保存菌株を供試菌株として村尾ら⁹⁾の方法を参考に行った。すなわち、50 ml YPG 培地 (酵母エキス0.4%, ポリペプトン0.5%, グルコース2%, K_2HPO_4 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2%) で、30°C の静置培養を行い、対数初期の菌体を集菌後、純水で3回洗浄し、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に O.D. (660 nm) 0.6~0.7 となるように懸濁させた。次に酵母懸濁液 2.5 ml に粗酵素液 (10 mg/ml) 1 ml を加え、30°C 3時間往復振とうしながら反応させ、濁度減少率で溶菌力を求めた。

菌学的諸性質はおもに長谷川武治編 微生物の分離と同定²¹⁾、長谷川武治編 改訂版微生物の分離と同定²²⁾および駒形和男編 微生物の化学的分類実験法²³⁾を参考にして検討した。

6. 放線菌 39-B 株全菌体中におけるジアミノピメリン酸の存在の検討

39-B 株を酵母エキス—グルコース培地 (酵母エキス1%, グルコース1%, pH 7.2) で 30°C, 2日間回転振とう培養 (160 rpm) を行い、遠心分離 (6000 rpm, 20分間) により集菌し、エタノール、アセトンにより脱水し乾燥菌とした。乾燥菌体 10 mg を 3 ml のサンプル管に

とり 6N HCl 1 ml を加え、100°C, 18時間加水分解後、東洋濾紙 No. 2 で濾過した。濾紙上の残渣を数滴の脱イオン水で洗浄し、その洗液を濾液に加えた。得られた濾液を減圧下で濃縮する操作を繰り返し HCl を除去後、最終残渣を 0.3 ml の脱イオン水に溶解し試料とした。調製した試料を2.6ジアミノピメリン酸を対照として、PPC をメタノール—水—10N HCl—ピリジン (80:17.5:2.5:10) の溶媒で下降法により展開した。展開後、0.5%ニンヒドリン含有ブタノールにより発色させ検討した。

7. 放線菌 39-B 株細胞壁中におけるグリシンの存在の検討

6.と同様に培養した 39-B 株の湿菌体 10 g を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 30 ml に懸濁し、少量のガラスビーズを加え超音波で細胞を破碎した。未破碎細胞及びガラスビーズを遠心分離 (3000 rpm, 15分間) で除き、上澄みを遠心分離 (15000 rpm, 15分間) して粗細胞壁を集めた。得られた粗細胞壁を90%エタノールで2回洗浄した後、2% KOH 含有エタノールに懸濁し、37°C に保ったインキュベータで振とうしながら2日間鹼化した。さらに95%エタノールで2回、脱イオン水で2回、0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で3回洗浄した。これをトリプシン溶液 (1 ml の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に 3 mg のトリプシンを溶解させたもの) で、37°C 2時間処理し、0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0) で2回、脱イオン水で2回、0.02N HCl でそれぞれ2回洗浄した。次にペプシン溶液 (3 mg のペプシンを 0.02N HCl 1 ml に溶解したもの) に懸濁させ、37°C で24時間処理した。その後、細胞壁の残渣を 0.02N HCl で2回、脱イオン水で2回、エタノールで2回、さらにクロロホルムで1回洗浄し減圧下で乾燥し試料とした。

調製した細胞壁 5 mg を 3 ml のサンプル管に入れ、6N HCl を 1 ml 加え 100°C 18時間加水分解した。分解後はジアミノピメリン酸と同様の操作で HCl を除き、最終残渣を 100 μ l の脱イオン水に溶解し試料とした。

また、同様に調製した試料を n-ブタノール—ピリジン—水—氷酢酸 (60:40:30:3) の溶媒を利用して下降法で PPC を行った。展開後ジアミノピメリン酸の場合と同様にニンヒドリン発色させグリシンの存在を検討した。

調製した試料をアミノ酸自動分析機 (日本電子株式会

社 JLC-3BC アミノ酸アナライザー) にかけてグリシンの存在を検討した。

8. 菌体中におけるマジュロースの存在の検討

1. と同様にして得た乾燥菌体 50 mg を 3 ml 容のサンプル管にとり 1N H_2SO_4 1 ml を加え 100°C 12時間加水分解した。その後、内容物を遠心分離し、上澄みを $Ba(OH)_2$, $BaCO_3$ で pH が 5.0~5.5 になるように調製した。生じた $BaSO_4$ の沈澱を遠心分離 (3000 rpm, 10分間) で除き上澄みを減圧下で濃縮乾固させ、0.4 ml の脱イオン水に溶かして分析試料とした。

分析試料を各種の糖と *Actinomadura libanotica* (IFO 14095) を分析試料と同様に処理した加水分解物を対照として、n-ブタノール-ピリジン-水-トルエン (5:3:3:4) の上層を溶媒として下降法で PPC を行った。

9. 形態学的観察

39-B 株を ISP II 培地および ISP IV 培地 (DIFCO 社) において 30°C 3 日間の静置培養を行い、その形態を観察した。

さらに、オートミール寒天培地 (DIFCO 社の BACTO OATMEAL AGAR と同様に調製した。) において 30°C 3 日間の培養を行いその形態を観察した。

実験結果

1. 溶菌酵素生産菌の検索

土壌サンプル82検体からクリアゾーン法により溶菌酵素生産菌を42株分離した。次に、A 培地で菌体外に酵素生産の認められた菌株 6 株について、B 培地および C 培

地でも同様の培養を行い検討した。その結果を Table 3 に示した。この中で、放線菌と思われる 39-B 株に強い酵素生産が認められたので、以後の実験には本菌を使用した。また、B 培地において初発 pH の影響を検討した結果を Fig. 1 に示した。その結果、初発 pH 6 付近で酵素生産が著しく向上した。次に、B 培地においてアルカリ処理菌体をグルコースに換え培養したところ、溶菌酵素は生産されず、本酵素がアルカリ処理菌体により誘導されることが明らかになった。さらに、B 培地にグルコース 0.05%, 0.1%, 0.3% を添加し初発 pH 6.0 とした培地で検討したところ、グルコース 0.05% 添加では酵

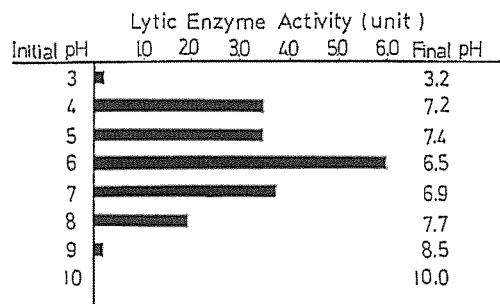


Fig. 1. Effect of initial pH of medium on production of lytic enzyme.

Cultural condition; *Actinomadura* sp. 39-B was inoculated to 30 ml of medium in 100 ml of Erlenmeyer flask and cultured at 30°C for 4 days with rotary shaker (160 rpm). Medium; B medium (pH was adjusted to 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 respectively).

Enzyme assay; enzyme activity was measured by the modified method of Tabata and Shiraishi which was based on increment of transparency of cell wall (*Rhodospiridium* sp.) suspension.

Table 3. Lytic Enzyme Production by Isolated Microbes

| Strain No. | A medium Lytic Enzyme (unit) | B medium Lytic Enzyme (unit) | C medium Lytic Enzyme (unit) |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 6 | 1.2 | 0.3 | 0.1 |
| 11 | 0.2 | 0.7 | 0.5 |
| 27 | 2.8 | 0.4 | 3.1 |
| 30 | 0.5 | 0.6 | 0.3 |
| 35-C | 3.2 | 1.1 | 2.1 |
| 39-B | 1.0 | 4.1 | 1.4 |

Cultural condition: each of microbes was cultivated in 30 ml of medium at 30°C for 4 days on rotary shaker (160 rpm).

素生産が6単位から9.5単位に向上したが、グルコース0.3%の添加では顕著に阻害された。グルコース0.05%

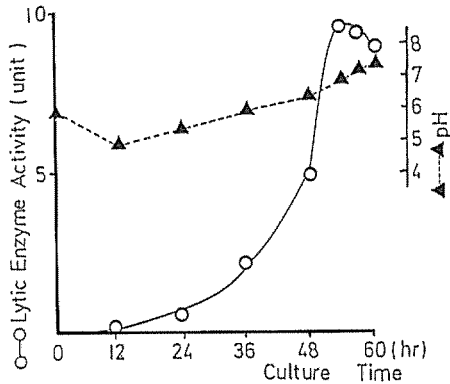


Fig. 2. Time course of lytic enzyme production. Cultural condition; *Actinomadura* sp. 39-B was inoculated to 30 ml of medium in 100 ml Erlenmeyer flask and cultured at 30°C with rotary shaker (160 rpm). Medium; B-medium + 0.05% glucose (pH 6.0). Enzyme assay; same as Fig. 1.

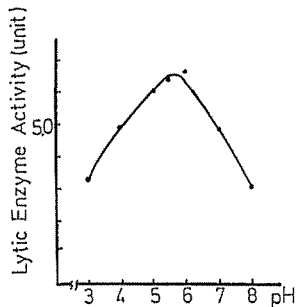


Fig. 3. Effect of pH of buffer solution on lytic enzyme activity. Lytic enzyme from *Actinomadura* sp. 39-B (lyophilized) was dissolved in 0.1 M McIlvaine buffer (pH 3-8) to become enzyme concentration at 0.5 mg/ml. Enzyme assay; same as Fig. 1.

添加の際の酵素生産経時変化を Fig. 2 に示した。

2. 溶菌酵素の性質

溶菌酵素の至適 pH を検討した結果を Fig. 3 に示した。その結果至適 pH 域は pH 5~6 の範囲にあった。また、各種酵母生細胞に対する溶菌力を Table 4 に示した。その結果、*Hansenula anomala* および *Saccharomyces diastaticus* には溶菌力を示したが *Candida utilis* には弱く *Rhodotulula* sp. z-13 にはほとんど溶菌力を示さなかった。

3. 化学的検索法

放線菌 39-B 株全菌体を加水分解して PPC を行った結果、Rf 値が標準サンプルと一致することにより MESO 体のジアミノピメリン酸が存在することが認められた。

細胞壁を加水分解して PPC を行った結果、グリシンの存在は認められなかった。また、アミノ酸自動分析機により分析した結果、グリシンの存在は認められなかった。

全菌を加水分解して対照として *Actinomadura libanotica* (IFO 14095) の加水分解物を用いて PPC を行った結果、Rf 値が標準サンプルと一致することにより本菌にはマジュロースが存在することが認められた。

4. 形態学的観察

ISP II 培地、ISP IV 培地で生育後顕微鏡観察を行った結果、(1)胞子嚢を欠く。(2)胞子分裂は一方にのみ起こる。(3)胞子は気菌糸上に生じる。(4)胞子は3個以上の連鎖となる。(5)胞子の連鎖は3~6個の範囲を超える等のことが判明した。

Table 4. Degradation of Various Yeast Living Cells with Lytic Enzyme

| Yeast strain | Degree of lysis (% reduction in O.D) | Yeast strain | Degree of lysis (% reduction in O.D) |
|----------------------------|---|-----------------------------|---|
| <i>Rhodosp.</i> sp. J-5B | 68 | <i>Hansenula anomala</i> | 48 |
| <i>Candida utilis</i> | 8 | <i>Sacch. diastaticus</i> | 38 |
| <i>Mycotorula japonica</i> | 0 | <i>Rhodotulula</i> sp. z-13 | 0 |

Composition of reaction mixture: lytic enzyme solution (10 mg/ml) 1.0 ml.
yeast suspension (pH 5.6) 2.5 ml.

The reaction mixture was incubated at 30°C for 3 hr with shaking.

さらにISP II (Yeast ext) 培地で生育させた結果、栄養菌糸の色が茶色であることが観察された。オートミール寒天培地生育させた結果、気菌糸の色が灰色であることが観察された。

考 察

Rhodospiridium sp. J-5B 株を溶菌する酵素生産菌株を広く土壌より分離した結果、細菌、放線菌、かびに細胞壁溶解能を有する菌株が分布していた。その中から、放線菌と思われる一菌株に特に強い溶菌活性が認められた。これまでの酵母細胞壁溶解酵素の多くは *Saccharomyces* sp. を対象にしたものが多く、赤色酵母については村尾ら^{8),9)} の報告した *Penicillium lilacinum* による *Rh. glutinis* の細胞壁溶解酵素生産、及び白石ら⁶⁾ の報告した細菌による *Sp. ruberrimum* の細胞壁溶解酵素生産が報告されているにすぎない。*Saccharomyces* 属を対照とした酵素の多くは、その至適 pH が中性から弱アルカリ性であるのに対し馬田ら¹⁰⁾、村尾ら^{8),9)} の報告や、本研究の場合その至適 pH が酸性側にあり、生細胞に対しても強い溶菌能を示すことから、酵母汚染によって商品価値を著しく低下させる酸性食品の保存料や、酸性下において酵母の溶菌処理が必要な工業的利用にも期待されうるものと考えられる。

各種酵母生細胞に対する本酵素の溶菌力においては、*H. anomala*, *S. diastaticus* に対してはすぐれた溶菌力を示したが、*Candida utilis* に対しては弱く、*M. japonica*, *Rh* sp. z-13 に対しては全く溶菌力を示さなかった。*Rhodospiridium* sp. J-5B 株が *Hansenula* sp. および *Saccharomyces* sp. などを溶菌するザイモリエイスでは溶菌され難く、本研究で得られた 39-B 株の生産する *Rhodospiridium* sp. J-5B 株溶菌酵素がザイモリエイス同様 *H. anomala*, *S. diastaticus* を溶菌することから、本酵素中にはザイモリエイスと同じ酵素が存在し、かつ、*Rhodospiridium* sp. J-5B 株を溶菌するためにザイモリエイス中には存在しないか、もしくは微量である他の因子を含んでいることが考えられる。例えば、ザイモリエイスの主成分が β -1,3グルカナーゼ、プロテアーゼ、マンナーゼ等であることから、39-B 株の生産する酵素にはこれらの他にキチナーゼ、 β -1,6グルカナーゼ等の存在が予想された。

放線菌類は分類学上かなり特異な位置を占める微生物の一群で、好気性放線菌のあるものは形態分化が著しく、極めて多彩な形態を示すが、形態観察は主観的であるために不確実性がつきまとい、ときには全く誤った判断を下すおそれがある。この様なことから細菌類と同様放線菌の分類においても形態学的特徴の他の指標を加味し、より普遍的な分類体系の確立を目指して各種の分類法が提案されてきている。近年は化学分類法が盛んに提案され細胞壁組成を主とする属の検索式²³⁾ が報告されているので、これに従い検討を行った。アミノ酸自動分析の結果、放線菌には一般に含まれていないメチオニンが検出されたが、検討した結果、グルコサミンがアミノ酸自動分析機でメチオニンと同じ位置に溶出ピークを持つことが判明し、メチオニンと思われたピークは菌体中の N-アセチルグルコサミンが加水分解したグルコサミンによるものと考えられた。化学的検索法の結果 39-B 株は *Planomonaspora*, *Planobispora*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Dermatophilus*, *Excellospora*, *Microbispora*, *Actinomadura* の属のいずれかに属することが分かった。次に、形態学的観察した結果を検索式で検討すると、他の *Actinomadura* についての記載²³⁾ と一致することが確認されたことから 39-B 株は *Actinomadura* 属であると判定された。

さらに、種について Preobrazhenskaya ら²⁴⁾ の *Actinomadura* 属の種検索式に従い検討を行った。ISP II 培地での観察結果と、オートミール寒天培地上で気菌糸が灰色であることより、39-B 株は *Actinomadura spadix* に属すると考えられた。さらに *Actinomadura spadix* を提案し、性質を記載した野々村²⁵⁾ の報告と比較し、ISP II 培地でのコロニーの裏側の色が Dark Brown になることで一致した。Bergey's manual²⁶⁾ の *Actinomadura spadix* の内容と、オートミール寒天培地及び ISP II (Yeast ext) 培地で生育させた結果の気菌糸等の色及び孢子数が一致することにより本菌は *Actinomadura spadix* に属すると考えられた。

要 約

研究室保存の酵母で生澱粉資化性の *Rhodospiridium* sp. J-5B 株の細胞壁溶解酵素生産菌を土壌から分離した。このうち酵素生産が著しい放線菌 39-B 株をえた。

この菌の生産する酵母溶菌酵素は現在市販のものと若干異なっているように思われた。また 39-B 株の菌学的性質を調べ同定を試みた結果、本菌は *Actinomadura spadix* に属すると考えられた。

文 献

- 1) T. KANEKO, K. KITAMURA and Y. YAMAMOTO: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 317 (1969)
- 2) K. KITAMURA, T. KANEKO and Y. YAMAMOTO: *Arch. Biochem. Biophys.*, 145, 402 (1971)
- 3) K. KITAMURA, T. KANEKO and Y. YAMAMOTO: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 57 (1972)
- 4) T. KANEKO, K. KITAMURA and Y. YAMAMOTO: *Agric. Biol. Chem.*, 37(10), 2295 (1973)
- 5) K. KITAMURA, T. KANEKO and Y. YAMAMOTO: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20, 323 (1974)
- 6) 白石 淳, 藤井久雄: 農化, 52, 553 (1978)
- 7) 田端司郎, 照井堯造: 醸酵工学, 40, 366 (1962)
- 8) S. MURAO, R. YAMAMOTO and M. ARAI: *Agric. Biol. Chem.*, 40(1), 23 (1976)
- 9) M. ARAI and S. MURAO: *Agric. Biol. Chem.*, 42(8), 1461 (1978)
- 10) 馬田三夫, 平緒一暁, 木村義夫, 野田国彦: 農化, 44, 393 (1970)
- 11) Y. KOBAYASHI, H. TANAKA, and N. OGASAWARA: *Agric. Biol. Chem.*, 38(5), 959 (1974)
- 12) R. KOBAYASHI, T. MIWA, S. YAMAMOTO and S. NAGASAKI: *J. Ferment. Technol.*, 58, 311 (1980)
- 13) R. KOBAYASHI, T. MIWA, S. YAMAMOTO and S. NAGASAKI: *J. Ferment. Technol.*, 58, 319 (1980)
- 14) R. KOBAYASHI, T. MIWA, S. YAMAMOTO and S. NAGASAKI: *J. Ferment. Technol.*, 59, 21 (1981)
- 15) K. TOTANI, S. HARUMIYA, F. NANJO and T. USUI: *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1159 (1983)
- 16) T. USUI, K. TOTANI, A. TOTSUKA and M. OGUCHI: *Biochem. Biophys. Acta*, 840, 255 (1985)
- 17) T. USUI and M. OGUCHI: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 535 (1986)
- 18) A. TOTSUKA and T. USUI: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 543 (1986)
- 19) Y. KOBAYASHI, H. TANAKA and N. OGASAWARA: *Agric. Biol. Chem.*, 38, 959 (1974)
- 20) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也: 農化, 58, 153 (1984)
- 21) 岡見吉郎, 清野昭雄: 微生物の分離と同定 長谷川武治編, 学会出版センター, 1979, p 155
- 22) 岡見吉郎, 清野昭雄: 改訂版微生物の分離と同定 <下>長谷川武治編, 学会出版センター, 1985, p 1
- 23) 長谷川徹, 清野昭雄: 微生物の化学的分類実験法 駒形和男編, 学会出版センター, 1982, p 47
- 24) T. P. PEROBRAZHenskAYA, M. A. SVESHNIKOVA and L. P. TEREKHOVA: *Actinomyces*, 12, 30 (1977)
- 25) H. NONOMURA and Y. OHARA: *J. Ferment. Technol.*, 49, 904 (1971)
- 26) Editor WILLIAM R. HENSLY: *BERGEY'S MANUAL Systematic Bacteriology Volume 4* p 2609, 1989