

葡萄糖异构酶研究概况

周相林

(江苏省化工设计研究所,南京)

葡萄糖异构酶可以将葡萄糖异构化为果糖。应用这种酶可以使葡萄糖浆中 45% 以上的糖分转化为果糖,使甜度大大提高,因而可用淀粉作原料生产出食用性良好的葡果糖浆。为了解决食糖供应不足,六十年代末期以来,葡萄糖异构酶的生产与应用的研究引起了人们的重视。本文拟对葡萄糖异构酶的研究概况作一简介。

Marshall 等^[1]开始研究葡萄糖异构酶,发现 *Pseudomonas hydrophila* 能在含木糖培养基中产生这种酶,随后逐渐引起人们重视,津村^[2]发现 *Aerobacter cloacae* 在木糖培养基上也产生葡萄糖异构酶,高崎义幸等^[3]对 *Bacillus megaterium* A-1 进行研究,发现该菌在含葡萄糖培养基中酶活较高。此后,高崎义幸等^[4]

用含有木糖或木聚糖的培养基从土壤分离出具有利用木聚糖的链霉菌,且可产生相当量的葡萄糖异构酶,由于含木聚糖物质来源丰富,价格低廉,因此不久即进行工业化生产。

近几年来,在毛主席革命路线指引下,我国对葡萄糖异构酶研究发展很快,全国已有很多单位开展这方面的工作,并取得了可喜的成绩。江西省食品发酵工业科学研究所^[5]研究了乳酸菌 D-80 葡萄糖异构酶的产生条件,上海植物生理研究所研究链霉菌 Kc-13 葡萄糖异构酶,葡萄糖的转化率为 40—50%,江苏省化工设计研究所等^[6]对链霉菌 Kc-13 进行诱变,获得了活性高的菌株链霉菌 Kc-13-575。最近,沈阳食品发酵研究所由原始森林腐植土中分离出一株玫瑰红链霉菌

336, 经诱变后酶活力达 160 单位/毫升以上, 每克葡萄糖加酶 35 单位, 转化率为 42%。

表 1 产生葡萄糖异构酶的菌种

菌 株	文 献
<i>Streptomyces</i> sp. YT 4	[7]
<i>Streptomyces</i> sp. YT 5	[4]
<i>Streptomyces</i> sp. YT 6	[8]
<i>Streptomyces venezulae</i> ATCC 21113	[9]
<i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL 3583	[10]
<i>Streptomyces olivaceus</i> NRRL 3316	[11]
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> ATCC 21114	[9]
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> Sk.	[12]
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> NRRL B-3559	[13]
<i>Streptomyces griseus</i>	[14]
<i>Streptomyces aureus</i>	[14]
<i>Streptomyces albus</i> 4	[32]
<i>Streptomyces glaucescens</i> ETH 22754	[15]
<i>Streptomyces bobilliae</i>	[16]
<i>Streptomyces volacconiger</i> CBS 409-73	[17]
<i>Streptomyces wedmorensis</i> ATCC 21175	[18, 35]
<i>Lactobacillus brevis</i>	[19]
<i>Lactobacillus manni-topoeus</i>	[19]
<i>Lactobacillus pentoaceticus</i>	[19]
<i>Lactobacillus gayonii</i>	[19]
<i>Lactobacillus</i> D-80	[5]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	[19]
<i>Heterolactic Acid bacteria</i>	[21]
<i>Aerobacter aerogenes</i>	[19]
<i>Aerobacter cloacae</i>	[21]
<i>Brevibacterium pentoso-aminoacidium</i>	[22]
<i>Brevi imperiale</i>	[19]
<i>Bacillus megaterium</i> A-1	[23]
<i>Bacillus coagulans</i> HN-68	[24]
<i>Bacillus species</i> NRRL 5350	[25]
<i>Bacillus species</i> NRRL 5351	[25]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	[26]
<i>Pseudomonas hydrophila</i>	[19]
<i>Escherichia intermedia strain</i> HN-500	[27]
<i>Micrococcus agilis</i>	[19]
<i>Micromonospora coerulea</i>	[28]
<i>Micromonospora rosea</i>	[28]
<i>Microellorospira flavoa</i>	[28]
<i>Nocardia asteroides</i>	[28]
<i>Nocardia dassonillei</i> IMRU 509	[28]
<i>Nocardia corullia</i> IFO 3338	[29]
<i>Actinoplances missonriensis</i>	[30]
<i>Paracecolobacterium aerogenoidis</i>	[31]

产生葡萄糖异构酶的微生物

据报道产生葡萄糖异构酶的菌种很多, 有放线菌、细菌等, 大多数是从土壤中分离出来的 (见表 1)。最近, 以链霉菌的报道较多, 如高崎义幸多次发表的 *Streptomyces albus* YT4 等菌种。放线菌与至今报道的细菌相比, 具有葡萄糖异构酶产量多, 酶的热稳定性好等优点, 并且在酶反应时不需要添加砷酸盐或锰盐等有毒物质。

分离异构酶产生菌, 一般采用木糖作唯一碳源, 如吉村贞彦等^[34]使用 D-木糖 1%、酵母膏 0.1%、磷酸氢二钾 0.05%、硫酸镁 0.025%、硫酸锰 0.001% 和碳酸钙 0.2% 组成培养基, 在含有 10 毫升上述培养基的试管中, 接入土样, 45℃ 培养 24 小时, 连续富集培养三次, 然后于加入 2% 琼脂的上述培养中, 进行平板分离, 移入斜面, 再进行摇瓶发酵, 测定葡萄糖异构酶活力。

除土壤分离新菌种外, 另外对原有菌种进行强烈因子处理。如 Bengtson^[30]用亚硝基胍或紫外线诱变 *Streptomyces* ATCC 21175, 能显著提高酶活, 经处理的菌种酶活力为 518 单位/毫升, 而不处理的仅有 318 单位/毫升。

葡萄糖异构酶发酵条件

一、碳源对形成葡萄糖异构酶的影响

葡萄糖异构酶是一种诱导酶, 一般需要在培养基中加入木糖一类物质, 才能促进酶的形成。但木糖价格昂贵, 不易实现工业化生产。高崎义幸研究可用麸皮代替木糖进行培养, 又用棉子壳与玉米芯的酸水解物代替木糖也收到好的效果 (见表 2)。

表 2 不同碳源对 *Streptomyces* sp. YT 5 葡萄糖异构酶活力的影响

碳源及添加量 (%)	酶 活 力 (单位/毫升)	蛋 白 质 (毫克/毫升)
不加	0.38	4.26
木 聚 糖 1	21.92	4.54
D-木 糖 1	25.52	5.12
D-葡萄糖 1	1.75	5.44
D-果 糖 1	0.50	5.44
D-山梨醇 1	0.38	3.98
D-半乳糖 1	0.13	4.40
D-甘露醇 1	0.00	5.98

基础培养基: 酪素酶解物 2%、硫酸镁 0.1%、氯化钴 0.024%、磷酸氢二钾 0.3%。 培养时间: 41 小时。

木聚糖是木糖的聚合体, 是一切陆地生长植物的主要成份, 含有木聚糖的物质有麸皮、玉米苞、玉米芯等, 从表 3 中可知木聚糖与木糖一样, 亦能作为酶的诱导剂。而葡萄糖、果糖、山梨醇、半乳糖、甘露糖对酶活力影响小或无作用。因此, 使用含有木聚糖的物

质能大量产生葡萄糖异构酶。培养 *Streptomyces* 5 用麸皮作碳源,产生异构酶活力高,菌体粗大易于过滤,在日本首先用于工业生产。

表3 含木聚糖的不同物质对 *Streptomyces* sp. YT 5 酶活力的影响

碳源	酶活力 (单位/毫升)	蛋白质 (毫克/毫升)
—	3.16	3.64
麸皮 1	9.38	5.40
2	19.9	5.94
3	30.0	6.04
4	22.24	5.88
玉米苞 1	13.6	5.68
2	21.5	5.50
3	22.8	5.04
4	5.50	3.98
玉米芯 1	15.50	5.46
2	20.84	5.70
3	20.50	5.16
4	7.74	3.98

基础培养基: 玉米浆 2%, 硫酸镁 0.01%, 氯化钴 0.024%。
培养时间: 24 小时。

另外, Park^[13] 等认为酸水解玉米芯或麸皮作为诱导剂,能促进酶的形成,而用碱水解却不产酶。高崎义幸^[12]指出麸皮浸出液(100℃ 2 小时),在 pH5.0, 80℃,用 α-淀粉酶处理后能增加 *S. albus* YT4 酶活及缩短发酵时间。又认为木二糖比木糖作为诱导物更有效,当培养基有木二糖或木聚糖和木糖共存时,酶活力更显著增加。高崎义幸在培养链霉菌时,添加 0.2% 木二糖到含有 0.5% 木聚糖的培养基中 pH7.0, 30℃, 培养 33 小时,与不加木二糖相比,酶活力能成倍增长。有些研究者报道^[24,33]在培养基中加入葡萄糖、山梨醇能维持一定 pH,同时山梨醇能增加产酶量。

二、氮源对生成葡萄糖异构酶的影响

高崎义幸认为玉米浆、酪素酸解液及酶解液对链霉菌产生葡萄糖异构酶较合适。多数都采用玉米浆作为氮源,也有使用硝酸铵、磷酸铵等作为氮源。Heady^[34]为促进酶产量,培养 *S. olivochromogenes* ATCC 21114 时,在培养基中加入甘氨酸及硝酸铵,能显著刺激酶活,增加酶量两倍多。

在培养链霉菌 Kc-13-575 时,豆饼粉可以代替玉米浆,同样也能产生较高的酶活力(见表 4, 5)。

三、其他因素对形成葡萄糖异构酶的影响

高崎义幸认为钴离子能显著地刺激 [*Streptomyces* sp. YT5 酶的形成,最适浓度为 $1 \times 10^{-3}M$, 镁离子却无作用,又认为 Fe^{+++} 、 Fe^{++} 、 Ca^{++} 、 Mn^{++} 、 Ni 等对

表4 不同有机氮源对链霉菌酶活力的作用

氮源 (%)	酶活力 (单位/毫升)	蛋白质 (毫克/毫升)	比活性(单位/ 毫克蛋白质)
—	4.16	3.74	1.11
玉米浆 1	14.50	5.76	2.52
2	21.92	6.26	3.50
酸解酪素液 1	19.60	5.56	3.53
2	20.88	5.38	3.83
酶解酪素液 1	13.76	3.76	3.66
2	21.68	4.34	5.00
酵母膏 1	9.68	3.84	2.52
2	12.60	4.32	2.92
蛋白胨 1	5.52	3.98	1.39
2	9.40	4.46	2.11
牛肉膏 1	6.60	3.88	1.70
2	8.80	4.16	2.12
大豆蛋白质 1	7.94	5.38	1.48
酶解液 2	11.28	6.26	1.80

菌种: *Streptomyces* sp. YT 5。

基础培养基: 麸皮 30%, 硫酸镁 0.1%, 氯化钴 0.024%。

培养时间: 24 小时。

表5 不同无机氮源对形成葡萄糖异构酶的影响^[24]

氮源 (0.3%)	细胞量 (毫克/毫升培 养液)	形成的果糖量	
		(毫克/20毫 克细胞)	(毫克/毫升 培养液)
—	4.6	0.75	0.17
氯化铵	5.7	2.26	0.65
硫酸铵	5.8	2.31	0.67
硝酸铵	5.7	1.84	0.52
磷酸氢二铵	1.2	2.50	0.15
酒石酸铵	4.1	2.95	0.60
醋酸钠	6.6	1.17	0.39
尿素	4.6	1.20	0.28
硝酸钾	4.0	0.96	0.19

酶有抑制作用。

在培养 *S. wudmorensis*^[35] 时,于最初阶段加入 0.05—0.25% 琼脂或加入羧甲基纤维素或硅藻土对生长是适合的,能改善微生物膜状生长,团球现象及增加酶产量。

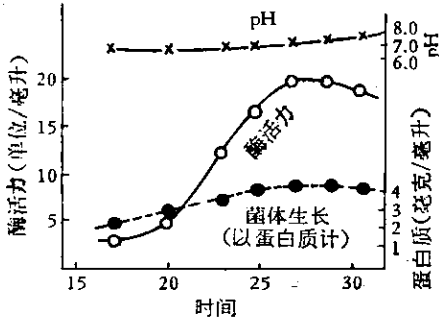
此外,在培养基中加入一些菜油、椰子油或表面活性剂对某些链霉菌也能促进产酶。

也有人在木糖培养基上培养 10 株不同乳酸菌加入 Co^{++} 、 Mg^{++} 均能促进酶的形成。

同时,通气与搅拌对酶的形成有很密切的关系,通气量大则菌体生长良好,而酶活力低,通气量小则结果相反,通气不足可造成菌体死亡而自溶,使部分胞内酶释出,因此必须掌握合理的通气条件。

在国外葡萄糖异构酶已进行工业化生产,简单的

发酵过程见图。



菌种: *Streptomyces 5*。

培养基: 麸皮 3%, 玉米浆 1%, 氯化钴 0.024%。

发酵条件: 搅拌 130 转/分, 通气量 1:0.33 (体积/体积/分), 温度 30℃。

图 22000 升罐葡萄糖异构酶的发酵过程

葡萄糖异构酶的特性

链霉菌葡萄糖异构酶的分子量根据沉降法和扩散法测定为 157000, 结晶酶含有钴、镁离子。

一、最适 pH

化学异构化在碱性条件下, 能使葡萄糖转化成果糖, 链霉菌葡萄糖异构酶最适 pH7.0 左右, 芽孢菌的葡萄糖异构酶最适 pH7.7—7.8。

二、最适温度

链霉菌葡萄糖异构酶当反应温度升高时, 最初反应速度是不断增加的, 这种酶是催化葡萄糖与果糖之间异构化的酶, 可将葡萄糖生成果糖或由果糖生成葡萄糖, 从葡萄糖生成果糖的反应是吸热反应, 因此反应温度高时, 有利于增大果糖生成比例。链霉菌葡萄糖异构酶最适温度是 80℃ 左右, 但超过 70℃, 酶易失活, 而且会引起分解着色, 因此实际应用温度为 65—70℃, 在此情况下, 最多只有 54—56% 葡萄糖转化为果糖。当葡萄糖与果糖都达到 50% 时, 反应即达到平衡(见表 6)。

表 6 在各种温度下平衡混合物的组成

反应温度(℃)	平衡混合物	
	葡萄糖(%)	果糖(%)
25	57.5	42.5
40	52.1	47.9
60	46.5	53.5
70	43.5	56.5
80	41.2	58.8

三、金属离子的影响

镁、钴离子对葡萄糖异构酶有显著的激活作用, 但镁离子的作用要依赖于底物的浓度, 葡萄糖低浓度时, 添加镁离子能起很大作用, 但在高浓度时, 添加镁离子作用就很小, 甚至缺乏镁离子, 酶仍有很大活力。在反应混合物中有钴离子存在, 能增强对热的稳定性, 尤其钴离子与镁离子一起作用时, 更显出很大作用(见表 7)。

表 7 金属离子对链霉菌葡萄糖异构酶活力的影响^[4]

金属离子 ($5 \times 10^{-3}M$)	相对活力 (%)
—	100
Mg ⁺⁺ (SO ₄ ⁻⁻)	366
Co ⁺⁺ (Cl ₂ ⁻⁻)	258
Mn ⁺⁺ (SO ₄ ⁻⁻)	52
Cu ⁺⁺ (SO ₄ ⁻⁻)	86
Ni ⁺⁺ (SO ₄ ⁻⁻)	17
Fe ⁺⁺⁺ (SO ₄ ⁻⁻)	52
Ca ⁺⁺ (Cl ₂ ⁻⁻)	72

四、其他因素的影响

高崎义幸等^[31]在对葡萄糖进行异构化时, 加入各种辅酶作为辅助因素, 发现 NAD 对 *Paracaclobacterium aerogenoides* 是必需的, 而 NADP、FMN 和 FAD 对酶活力是无作用的, 获得最适异构化的 NAD 浓度是在 100 微克/毫升。

在异构化时, 加入亚硫酸能提高果糖产率, 减少颜色形成及保护酶对热的稳定性。

使用能捕捉所生成果糖的物质, 如加硼酸进行反应, 可使 88—90% 葡萄糖转化成果糖, 但硼酸有毒, 不能应用于工业。

高浓度葡萄糖液作为底物, 对酶也发生抑制作用, *S. phaeochromogenes* 的葡萄糖异构酶除 D-葡萄糖和 D-木糖可作为底物外, 对其他糖均无活力, 就是磷酸化葡萄糖也产生阴性反应, 显然该酶是不属于磷酸化葡萄糖异构酶。

五、菌体自溶与酶的释放

葡萄糖异构酶是胞内酶, 在培养过程中, 随菌体衰老而自溶, 在工业生产中, 一般不制成酶制剂, 直接使用菌体或由菌体制成固相酶用于工业化生产。若要制成精制品或固相酶, 需要将酶释放, 多数是使用物理的或化学的方法等。

物理法: 对细胞悬浮液一般进行超声波处理, 频率 10Kc 处理 10 分钟左右, 经高速离心, 除去细胞碎片等, 应用上清液作为酶液。

化学法: 在细胞悬浮液中加入 0.1% 十六烷基氯化吡啶等^[36], 使细胞自溶, 一般在 12 小时后, 离心即

得酶液。加入各种有机溶剂,对酶释放作用不大,加入阳离子表面活性剂, pH6.5, 40℃, 对酶释放效果显著(见表8)。

表8 表面活性剂对酶释放的作用

表面活性剂	种类	释放酶 (单位/ 毫升)	总酶活力 (单位/ 毫升)	释放率 (%)
—		1.2	10.6	11.3
十二烷基苯磺酸钠	阴离子	2.4	10.1	23.8
十二烷基醇磺酸钠	阴离子	3.8	11.2	33.9
正十二烷基苯磺酸钠	阴离子	1.9	11.7	16.2
十六烷基氯代吡啶	阳离子	8.4	11.9	70.6
十二烷基氯代吡啶	阳离子	10.4	11.6	89.7
十六烷基三甲基溴化铵	阳离子	9.9	11.6	85.3
聚氧代乙烯山梨醇酐单油酸酯	非离子	2.9	10.9	26.6

生物法: 在细胞悬浮液中加入溶菌酶, 使细胞发生自溶。

固 相 酶

到了六十年代末期, 日本、美国、丹麦等国家相继发展了固相酶。这是一种新型的酶制剂, 它是把水溶性的酶制剂连接到固体载体上, 它具有稳定性好, 适合于连续性、自动化和管道化生产, 近年来有较大的发展。特别是许多缺糖或糖产量不足的国家, 都利用各种方法制备的固相酶从淀粉中制取异构糖, 它的甜度可以达到蔗糖的115%, 为食糖生产开辟了一个新途径, 从而使淀粉糖的产量急剧上升。

丹麦诺伏公司专门研究和生产固相酶, 据该公司介绍, 固相酶的特点如下:

1. 采用固相酶可以连续转化, 酶用量低, 转化效率高。1公斤固相酶可生产1000公斤葡萄糖。
2. 细胞直接固定于载体上, 并可以制成不同形状。应用于单批转化时, 可重复使用5—6次, 应用于连续转化时, 可重复使用32天。
3. 连续转化时, pH可以提高到8.5。不要加活化剂氯化钴。
4. 工艺损耗仅有百分之三。1吨淀粉可制得葡萄糖浆(按75%固形物计)1.3吨。

葡萄糖异构酶固相化方法大致有两种, 即以抽出酶的固相化法和利用其胞内酶在菌体内固定化法。前者又可分为吸附法、包埋法和共价键结合法等。而且也有采用二者兼具的方法。

一、菌体固相化

(一) 加热固定

由于葡萄糖异构酶耐热性能好, 在80℃下短时间

稳定。将菌体在60—70℃热处理10分钟, 使胞内酶系破坏, 而葡萄糖异构酶基本完整无损保存于死细胞内。

经热处理的细胞, 在自溶条件下, 葡萄糖异构酶也不再释放胞外, 胞内仍保留80—90%酶活力, 而不经热处理的细胞, 则胞内酶100%自溶释放。用此法固定酶, 方法简单, 成本低, 工业上易采用。工业生产中热处理菌体可直接在发酵中进行, 不用水洗净菌体, 将发酵液很快加热到60—70℃处理10分钟, 菌体被杀死, 酶固定在细胞内, 然后将菌体以硅藻土为助滤剂过滤, 去除发酵液及杂质, 得到干净菌体, 用于异构化反应。

热处理要以新鲜菌体在最高产酶期25—30小时即进行热处理, 热处理过的菌体在70℃使葡萄糖异构化时, 无论浓度高低, 菌体都不会发生自溶, 经热处理的菌体有以下特点:

1. 菌体可以反复使用: 高崎义幸^[37]将 *Streptomyces* sp. YT5 菌体经65℃处理10分钟, 菌体可以反复使用七次。但酶活逐渐下降, 如第1次异构化为100%(实际转化率为5%), 则第2次为86%, 第3次为76%, 第4次为69%, 第5次为53%, 第6次为50%, 第7次仅有34%。若继续异构化, 则需补充酶量。
2. 可以连续异构化: 经15天连续异构化, 平均异构率为40%。

(二) 包埋菌体

利用角蛋白包埋热处理菌体, 向菌体悬浮液中加入适量明胶角蛋白, 再用戊二醛等鞣剂。经过鞣制作为膜状固相酶^[38], 除角蛋白外, 酪蛋白、纤维蛋白等可同菌体反应而制成固相酶膜。由角蛋白包埋的菌体酶, 相当稳定。

也有的采用聚丙烯酰胺凝胶包埋热处理菌体。

(三) 吸附法

具有四级吡啶阴离子的树脂, 有吸附菌体能力, 将异构酶生产菌细胞悬浮散于pH 6—8缓冲液中, 在搅拌下加入上述树脂(菌体与树脂之比为1:0.2—0.5), 菌体就牢固吸附于树脂, 然后将这种吸附菌体的树脂, 再加入玻璃丝等物作填料, 装柱后可供葡萄糖异构化之用。

(四) 交联法

将链霉菌发酵液, 加入相当菌体量50%的戊二醛溶液, 于室温下搅拌, 加入助滤剂过滤。滤饼用水洗去杂质等, 酶回收率为90%。

二、抽出酶的固相化

(一) 吸附法

是将酶吸附于不溶性载体上, 有离子吸附和物理

吸附两种。由于葡萄糖异构酶是比较偏酸性的酶蛋白。前项的离子结合中使用阴离子交换树脂,如将酶吸附在 DEAE-葡聚糖凝胶或离子交换树脂上制成固相酶。较岛将阴离子交换剂 Duolite A7 用来吸附酶,能得到良好结果。

其次 Messing^[59] 以矾土为载体,通过物理吸附而进行固相化,这时吸附的酶很好渗透到多孔性矾土内部,矾土孔径为 100—1000 Å。固相化方法是把酶溶液加到醋酸镁和醋酸钴溶液处理过的矾土上,维持一夜以上,使酶吸附。酶的吸附率最高为 76%,在连续反应中半衰期为 49 天。

(二) 包埋法

是将酶包埋于高分子凝胶的网目结构上的方法。Strandberg 等人用聚丙烯酰胺对酶试用包埋固相化。对 90% 聚丙烯酰胺,加入 10% 交联剂 N', N'-甲叉二丙酰胺制成凝胶,把加入的酶包埋凝胶中。凝胶大小为 150—1000 微米,进行连续反应时活力可以持久。还有报道应用聚丙烯酰胺进行放射线聚合,对酶进行包埋,在 20% 凝胶(酶:交联剂=10:1)下用 40 千拉得(krad)的 γ 射线进行聚合,在聚合的凝胶酶复合体中保留加入酶的 50—60% 活性。增加了酶对热的稳定性。

(三) 共价键结合法

是将酶用共价键结合到载体而固相化的方法,所得到的键非常稳定,但此方法操作比较复杂。据文献报道,应用多孔玻璃球固相化葡萄糖异构酶时,先把多孔玻璃球芳香胺硅烷化,然后重氮化,再和酶偶联。在 pH8.5, 54℃ 反应,可保留结合酶活力约 40—50%,比游离酶有良好的稳定性,在连续反应中半衰期为 12—14 天。

最近 Lee 等^[60]报道,用 ZrO₂ 涂层的多孔玻璃硅烷化后,通过戊二醛和酶偶联,得到在 50℃ 连续反应时,半衰期为 240 天的固相葡萄糖异构酶。

此外,国内从事异构酶研究的科技工作人员,正在开展用明胶戊二醛和琼脂豆腐粉固相化菌体的研究,为把国民经济搞上去,他们坚持自力更生,土法上马,葡萄糖异构酶固相化必将不断取得新的成绩。

参 考 资 料

[1] Marshall, R. O. et al.: *Science*, 125: 648, 1957.
[2] Tsumura, N.: *Agr. Biol. Chem.*, 25: 616, 1961.
[3] 高崎义幸: 日本农芸化学会誌, 36: 1010, 1013, 1962.
[4] Takasaki, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 30: 1247, 1966.

[5] 江西食品发酵工业研究所: 微生物学报, 15: 72, 1975.
[6] 江苏省化工设计研究所等: 微生物学通报, 3: 15, 1976.
[7] 高崎义幸: 日本特许公报, 昭 44—16, 352, 1969.
[8] 高崎义幸: 日本特许公报, 昭 49—42555, 1974.
[9] Iizuka, H. et al.: *Ger. offen.*, 1,394,461 1971.
[10] Brownwell, C. E.: *Ger. offen.*, 2,018,085, 1971.
[11] Brownwell, C. E.: *Ger. offen.*, 2,219,713, 1971.
[12] Tsumura, N. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 29: 1129, 1965.
[13] Park, Y. K. et al.: *C. A.*, 83: 41484, 1975.
[14] Ichiro, C. et al.: *Ger. offen.*, 2,420,102, 1974.
[15] Weber, P.: *Ger. offen.*, 2,408,708, 1974.
[16] 高崎义幸: 日本特许公报, 昭 41—7428, 1966.
[17] Leroy, P. et al.: *Ger. offen.*, 2,417,642, 1974.
[18] Dworschack, R. G.: *Ger. offen.*, 2,017,591, 1971.
[19] 中山啓: 日本特许公报, 昭 40—20230, 1965.
[20] Bengtson, B. L. et al.: *C. A.*, 79: 124,723, 1973.
[21] Tsumura, N. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 29: 1123, 1965.
[22] 市村正道: 日本农芸化学会誌, 39: 291, 1965.
[23] 高崎义幸: 日本特许公报, 昭 39—29820, 1964.
[24] Yoshimura, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 30: 1015, 1966.
[25] Aunstrup, K. et al.: *Ger. offen.*, 2,164,342, 1972.
[26] Degen, L. et al.: *Ger. offen.*, 2,413,939, 1974.
[27] Nataka, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 30: 887, 1966.
[28] Horwath, R. O.: *Ger. offen.*, 2,247,922, 1973.
[29] Sato, K. et al.: *C. A.*, 82: 123337r, 1975. 586, 1974.
[30] Scallet, B. L. et al.: *Staerke.*, 26: 405, 1974.
[31] Takasaki, Y. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 30: 220, 1966.
[32] 高崎义幸: 日本公开 特许公报, 昭 49—108, 285, 1974.
[33] Dworschack, R. G.: *U. S. P.*, 3,736,232, 1973.
[34] Heady, R. E.: *Ger. offen.*, 2,223,864, 1974.
[35] Dworschack, R. G. et al.: *Brit. P.*, 1,274,646, 1972.
[36] 高崎义幸: 工業技術院微生物工業技術研究所報告, 37: 23, 1969.
[37] 高崎义幸: 工業技術院微生物工業技術研究所報告, 37: 31, 1969.
[38] Vieth, W. R. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 15: 565, 1973.
[39] Messing, R. A.: *Ger. offen.*, 2,405,353, 1974.
[40] Lee, Y. Y. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 18(3): 389, 1976.