

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-188063

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)9月25日

C 12 N 9/02

7236-4B*

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ケトパントラクトンリダクターゼの製造方法

⑯ 特 願 昭59-46139

⑰ 出 願 昭59(1984)3月9日

⑱ 発 明 者 山 田 秀 明 京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

⑲ 発 明 者 清 水 昌 京都市中京区西ノ京伯楽町14

⑳ 発 明 者 畑 啓 之 加古川市上荘町国包189-1

㉑ 出 願 人 製鉄化学工業株式会社 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ケトパントラクトンリダクターゼの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) リゾプス属、アスペルギルス属、ピソク
ラミス属、オーレオバシジウム属、シゾサツカロ
マイセス属、ビチア属、ハンセヌラ属、エンドマ
イコブシス属、シテロマイセス属、デバリオマイ
セス属、スポロポロマイセス属、トルロブシス属、
キャンデイダ属、ロドトルラ属、トリコスボロン
属、アグロバクテリウム属、エアロバクター属、
アクロモバクター属、フラボバクテリウム属、ス
タフィロコツカス属、ミクロコツカス属、アルス
ロバクター属、セラチア属、プレビバクテリウム
属、アシネトバクター属、シユードモナス属、キ
サントモナス属に属するケトパントラクトンリダ
クターゼ生産菌を栄養培地で培養して菌体内にケ
トパントラクトンリダクターゼを蓄積せしめ、該
菌体からケトパントラクトンリダクターゼを採取
することを特徴とするケトパントラクトンリダク

ターゼの製造方法。

8. 発明の詳細な説明

本発明はケトパントラクトンを還元してD-パ
ントラクトンを与える反応を触媒するケトパント
ラクトンリダクターゼの製造方法に関する。

D-パントラクトンはパントテン酸、C₆A等
の重要な合成中間体である。従来、D-パントラ
クトンは

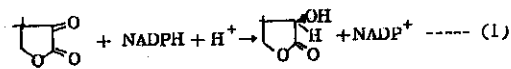
(1) 化学的に合成されたDL-パントラクトン
より光学分割剤を用いてD-体のみを取り出す方
法。

(2) ケトパントラクトンをキラルなリガンド
を持つロジウム触媒で不斉還元する方法。

(3) ケトパントラクトンを微生物菌体の有す
立体選択的な還元能力を用いて不斉還元する方
法が知られているが、(1)ではキニーネ、ブルシン等
の高価な分割剤が必要であること、(2)では高価な
触媒を多量に用いねばならないこと、水系加圧下
の反応であるため取扱が厄介であること、(3)では
少量のL-パントラクトンの副生がさけられない

こと等の欠点があった。

本発明者らは工業的に有利なD-パントラクトンの製造方法を種々検討した結果、微生物菌体より取り出した酵素を利用してケトパントラクトンをD-パントラクトンに有利に導き得ることを見出した。



ケトパントラクトンを還元してD-パントラクトンを与える反応を触媒するケトパントラクトン(以下KPLと略す)リダクターゼに関する報告は現在までにWilkenらの一連の報告があるのみである。(たとえばJ.Biol.Chem.249, 4689 - 4695 (1974))

これらの報告に示されている菌体はサツカロマイセス・セレピシエNRRL Y-2034, サツカロマイセス・セレピシエ A364A, エスケリチア・コリア TCC9687 およびエルビニア・マトグラフィーの4菌株のみであり、このうちサツカロマイセス・セレピシエ A364A, エルビニア・マトグラフィー

は酵素を部分精製しているにとどまっている。

さらにエスケリチア・コリアに關してもその酵素の量的なことは不明瞭である。一番記述のはつきりしているサツカロマイセス・セレピシエNRRL Y-2034に關しては該酵素の比活性がcell-free extractの段階において0.009 unit/mg 蛋白とかなり低い値を示しているにとどまっている。このような状況に鑑み本発明者らは工業的に有利なKPLリダクターゼを得る目的で、多数の菌株のcell-free extractを調製し、その蛋白含有量とKPLリダクターゼ活性、さらに生成するパントラクトンのD,L体の比率をD-クロロ炭酸メンチルによりジアステレオマーとした後、ガスクロマトグラフィーで分析する方法(Anal. Biochem. 118, 9-16 (1981))によりスクリーニングを進めた。その結果いくつかの属に属する菌株が秀れたKPLリダクターゼ酵素源となることを見出し本発明に至った。

即ち本発明の要旨はリゾプス属、アスペルギルス属、ピソクラミス属、オーレオバシジウム属、

シゾサツカロマイセス属、ピチア属、ハンセセラ属、エドマイコブシス属、シテロマイセス属、デバリオマイセス属、スポロポロマイセス属、トルロブシス属、キャンデイダ属、ロドトルラ属、トリコスボロン属、アグロバクテリウム属、エアロバクター属、アクロモバクター属、フラボバクテリウム属、スタフィロコツカス属、ミクロコツカス属、アルスロバクター属、セラチア属、プレビバクテリウム属、アシネトバクター属、シユードモナス属、キサントモナス属に属するケトパントラクトンリダクターゼ生産菌を栄養培地で培養して菌体内にケトパントラクトンリダクターゼを蓄積せしめ、該菌体からケトパントラクトンリダクターゼを採取することを特徴とするケトパントラクトンリダクターゼの製造方法である。

本発明の要旨はムコール属、リゾプス属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウム属、ジベレラ属、グリオクラジウム属、オーレオバシジウム属、フィトフトラ属、シリンドカルボン属、ピソクラミス属、ピチア属、ハンセセラ属、シユバ

ニオマイセス属、デバリオマイセス属、スポロポロマイセス属、サツカロマイセス属、クリプトコツカス属、トルロブシス属、キャンデイダ属、トルラ属、ロドトルラ属、トリコスボロン属、シゾサツカロマイセス属、シテロマイセス属、エンドマイコブシス属、トラメテス属、ビシノボラス属、アグロバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エアロバクター属、アクロモバクター属、フラボバクテリウム属、スタフィロコツカス属、ミクロコツカス属、アルスロバクター属、プレビバクテリウム属、シユードモナス属、キサントモナス属、マイコバクテリウム属、セラチア属、アシネトバクター属のいずれかに属し、内にKPLリダクターゼを産生する能力を有する微生物を当該微生物菌体栄養培地で培養して菌体内にKPLリダクターゼを蓄積せしめ、次いで当該菌体よりKPLリダクターゼを採取することを特徴とするKPLリダクターゼの製造方法である。

本発明においてKPLリダクターゼ産生菌として用いられる微生物は上記の属に属し、菌体内に

KPLリダクターゼを蓄積する能力を有するものであればいずれでもよく、その具体例としてはリゾプス・オリザエIFO 5440, アスペルギルス・ニガーIFO 4848, ピソクラミス・フルバIFO 7901, オーレオバシジウム・ブルランスIFO 4465, シゾサツカロマイセス・ボンペIFO 0346, ビチア・フアリノサIFO 0193, ハンセスラ・アノマラIFO 0569, エンドマイコプシス・ビスボラIFO 0808, シテロマイセス・マトリテンシスIFO 0954, デバリオマイセス・ハンセニルIFO 0794, スポロポロマイセス・ホルサテिकासIFO 1032, クリプトコツカス・ネオフォーマンスIFO 0410, トルロプシス・キャンデイダIFO 0380, キャンデイダ・パラブシロシスIFO 0708, ロドトルテ・テキセンシスIFO 0920, トリコスポロン・キャピテイタムIFO 0748, エアロバクター・クロアカエIAM 1221, セラチア・ブリムチカムIFO 3055, アクロモバクター・ポリモルフIFO 3160, フラボバクテリウム・スアベロレンズIFO 3752, アグロバクテリウム・ツメファ

シエンスIAM B-26-1, ミクロコツカス・ルテウスIFO 3064, コリネバクテリウム・グルタミカスATCC 13060, スタフィロコツカス・オーレアスIFO 3060, アルスロバクター・グロビフォルミスIFO 12137, プレバクテリウム・インセルタムIFO 12145, アシネトバクター・カルコアセテिकासIAM 1517, シユードモナス・シリंगाエIFO 12655, キサントモナス・キヤムベストリスIAM 1671などが挙げられる。またこれらの菌の天然および人工変異菌であつてもKPLリダクターゼ産生能を有するかぎり同様に使用することができる。

本発明を実施するに当つて、まず前記のKPLリダクターゼ産生菌の培養が行われる。培養方法は液体培養でも固体培養でもよいが、工業的にはKPLリダクターゼ産生菌を液体培地に接種し通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられる炭素源、窒素源、無機塩、有機微量栄養源などを微生物の種類に応じて適宜選択すればよい。培養温度は菌

が生育しKPLリダクターゼを産生する範囲内で適宜選択すればよく、一般的には15～50℃であり、培地のpHは通常3～10の範囲が適当である。培養時間は微生物の種類に応じて適宜選択すればよく、KPLリダクターゼの活性が最高に達する時期をみはからつて適当な時期に培養を終了すればよい。かくして得られた培養物においてKPLリダクターゼは該微生物菌体内に蓄積されてくる。

このようにして得られた培養物よりKPLリダクターゼを抽出し、粗製のKPLリダクターゼ含有液を得るための方法は格別制限されるものではなく、その具体的な例として、例えば培養液を固液分離し得られた湿菌体を必要に応じてリン酸緩衝液やトリス塩酸緩衝液などに懸濁せしめ、次いでリゾチーム処理、超音波処理、フレンチプレス処理、ガラスビーズ、石英砂等での磨砕処理、界面活性剤での溶菌処理などの菌体処理手段を適宜選択して組合せることによつて菌体内よりKPLリダクターゼを抽出し、得られた抽出液より適当

な分離手段で残渣を除去することによつて粗製のKPLリダクターゼ含有液(cell-free extract)が得られる。

次いでこの粗製KPLリダクターゼ含有液は、蛋白質、酵素などの単離、精製手段として公知の方法を用いることにより精製されたKPLリダクターゼを得ることができる。かかる単離、精製手段の具体例として、例えば硫酸分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、吸着クロマトグラフィー法、ゲル濾過法等を挙げることができ、必要に応じて適宜組合せて用いられる。

かくして得られるKPLリダクターゼは前記反応(1)を触媒する酵素であり、臨床検査用試薬、研究用試薬などとしても有用である。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

なお実施例中の%はとくに断りのないかぎり重量基準であり、またKPLリダクターゼの酵素活性測定法などの分析法は以下の通りである。

(1) 酵素活性測定法

220 mM NADPH, 200 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.5) を含む水溶液 2.5 ml に酵素液 5 ml を加えて窒素雰囲気下 30°C で 8 分間放置して一定温度とした後、100 mM 溶液で 10 ml 加えて反応を開始させ、340 mμ の吸光初期減少をスペクトロメーター (日立 Model 200-10 spectrometer) で測定することにより、酵素活性を測定した。KPL リダクターゼ酵素活性は 1 分間に 1 mM の NADPH を消費する酵素量を 1 単位 (U) とする。

(2) 蛋白質の定量

Bovine serum albumin (BSA) を標準とする Lowry 法で定量する。

(3) D-パントラクトンの定量

0.5 M のリン酸カリ緩衝液 0.8 ml に 40.0 mg の NADPH (44.2 mM) と cell-free extract 0.2 ml を加え、そこに塩酸を含む水に溶解したケトパントラクトンの 2 M 溶液を 2 分毎に 2 ml ずつ 10 回添加する方法で反応を行なわせた。ケトパントラクトンの添加終了後さらに 30 分間熱成して所定の方法で反応液を分析し、全生成パントラクト

ンに占める D-パントラクトンの比率を D (%) で示した。なお、反応温度は 30°C であった。

(4) 至適 pH

(1) の酵素活性測定法で用いた標準反応液を用い pH 5.0 ~ 8.0 のリン酸カリ緩衝液, pH 7.5 ~ 9.0 のトリス-塩酸緩衝液, pH 8.5 ~ 9.5 のグリシン-苛性ソーダ緩衝液を用いて活性を測定し、その至適 pH を求める。

(5) pH 安定性

(4) の至適 pH 測定で用いた各 pH の緩衝液に酵素液を加えて 30°C で 30 分間放置した後、KPL リダクターゼ活性の残存率を測定する。

(6) 熱安定性

20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C の各温度で 10 分間酵素液を処理し、その残存活性を測定する。

(7) Km 値

KPL, NADPH に対する Km 値を測定する。
実施例 1

麦芽エキス 5%, 酵母エキス 0.3%, 寒天 2%

からなる寒天斜面培地 (pH 6.0) で 28°C, 48 時間培養したキャンディダ・パラブシロシス IFU 0708 の 1 白金耳菌を、麦芽エキス 5%, 酵母エキス 0.3% からなり pH 5.0 に調整、加熱滅菌した液体培地 5 ml, 3 本に植菌し、28°C で 48 時間振盪培養した。次に種菌用液体培地と同じ組成の加熱滅菌した液体培地 500 ml を入れた 2 l 坂口フラスコ 40 本に前記培養液をそれぞれ植菌し、28°C で 48 時間振盪培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を得た。

次いで 0.1 mM ジチオスレイトールを含む 0.02 M リン酸カリ緩衝液 (pH 7.0) 800 ml に菌体を懸濁後、超音波処理により KPL リダクターゼを抽出し、遠心分離によつて不溶物の除去を行い、得られた上澄液にまず 60% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、生じた沈澱物を遠心分離で除去したのち、その上澄液にさらに硫酸アンモニウムを終濃度 80% 飽和になるように加え、KPL リダクターゼを沈澱せしめた。得られた沈澱物を 0.1 mM ジチオスレイトールを含む 0.02 M

リン酸カリ緩衝液 (pH 7.0) 100 ml に溶解し、次いでこの溶解液を 0.3 mM ジチオスレイトールを含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で透析し、予め 0.1 mM ジチオスレイトールを含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液で平衡化した DEAE-セファセルカラム (径 5 cm, 長さ 40 cm) に通して KPL リダクターゼを吸収させ、同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液と 0.5 M の塩化カリウムを溶解した同緩衝液とで濃度勾配を作り、徐々に塩化カリウム濃度を上げながら KPL リダクターゼを溶出させた。溶出された KPL リダクターゼ活性成分を集め、70 ~ 100% 飽和硫酸アンモニウムで沈澱してくるものを、0.1 mM ジチオスレイトールを含む 0.02 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 5 ml に溶解し、さらにこの溶液に濃度が 4 M となるように食塩を加えた。この溶液を 0.1 mM ジチオスレイトール, 0.02 M リン酸カリ緩衝液 (pH 7.0) および 4 M 食塩よりなる溶液で平衡化したフェニルセファロース CL-4B カラム (径 1 cm, 長さ 10 cm) に通して KPL リダク

ーゼを吸着させ、同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液(4M食塩)と食塩を含まない同緩衝液とで濃度勾配を作り、徐々に食塩濃度を下げながら、KPLリダクターゼを溶出させた。溶出されたKPLリダクターゼ活性画分を集め、90%飽和硫酸アンモニウムで沈澱してくるものを2mlの0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH7.0)に溶解し、同緩衝液で平衡化したセフアデックスG-75カラムにてグル戸過を行い、KPLリダクターゼ活性画分を集め、90%飽和硫酸アンモニウムで沈澱してくるものを1mlの0.1mMジチオスレイトールと0.02Mのリン酸カリ緩衝液(pH7.0)に溶解し、さらにポリエチレングリコールを添加して一夜放置し、KPLリダクターゼを結晶化させた。生成した結晶を遠心分離にて回収し、KPLリダクターゼ標品5mgを得た。このものの比活性は175U/mg、培養液からの収率は14.6%であつた。至適pHは7.0~7.5であり、pH安定性は6.0~8.0、熱安定性は30℃以下、KPLおよびNADPHに

た培養液40本より戸過により得られた菌体を0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH7.0)800mlに懸濁後、ガラスビーズ処理により菌体を破砕し、遠心分離によつて不溶物の除去を行ない、上澄液を得た。この上澄液を実施例1と同様の方法で処理しKPLリダクターゼ標品7mgを得た。

このものの比活性は172U/mg、培養液からの収率は21.0%であり、その他の酵素的性質は実施例1の場合とはほぼ同等であつた。

実施例4

第1表に示した各種の酵母を用いることおよび使用する坂口フラスコが1本であること以外は実施例1と同様な方法で培養、集菌した菌体を0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH7.0)20mlに懸濁後、超音波処理、遠心分離により上澄液を得た。このようにして得られた各上澄液の蛋白含有量、KPLリダクターゼ活性および生成ペントラクトンのD体比率を測定し第1表に示す。

に対するKm値はそれぞれ0.80mM、0.12mMであつた。

実施例2

アグロバクテリウム・ツメファシエンシIFO18264の1白金耳量をグルコース5%、コーンステープリツカー8%、炭酸カルシウム1%からなるpH7.0に調整、加熱滅菌した液体培地5ml、3本に接種し28℃で48時間培養した。次にこの培養液を接種用液体培地と同じ組成の加熱滅菌した液体培地500mlを入れた2l坂口フラスコ40本にそれぞれ接種し、28℃で48時間振盪培養した。培養終了後遠心分離により得られた菌体を実施例1と同様に処理してKPLリダクターゼ標品6mgを得た。

このものの比活性は181U/mg、培養液からの収率は13.4%であり、その他の酵素的性質は実施例1の場合とはほぼ同等であつた。

実施例3

実施例1で示した培地500mlでアスペルギルス・ニガーIFO4848を2日間培養して得られ

なお、上記上澄液を実施例1と同様にしてDEAEセフアセルの段階まで部分精製することにより、実施例1で得られたKPLリダクターゼとはほぼ同等の酵素的性質を有するKPLリダクターゼ単離することができた。

第1表

生産菌	比活性(U/mg蛋白)	D(%)
シソサツカロマイセス・ボンベ IFO 0846	0.07 g	96.1
ビチア・フアリノサ IFO 0198	0.13 g	95.8
ハンセメラ・アノマラ IFO 0569	0.124	93.6
エンドマイコプシス・ビスボラ IFO 0803	0.074	94.9
ジテロマイセス・マトリテンシス IFO 0954	0.090	92.5
デバリオマイセス・ハンセニル IFO 0794	0.194	95.5
スポロボロマイセス・ホルサティカス IFO 1082	0.203	95.9
クリプトコッカス・ネオフォーマンズ IFO 0410	0.172	96.1
トルロプシス・キャンデイダ IFO 0880	0.166	92.4

キャンディダ・パラブシロシス IFO 0708	0.154	92.1
ロドトルラ・テキセンシス IFO 0920	0.178	97.9
トリコスポロン・キヤピテイタム IFO 0748	0.162	95.8

実施例 5

第 2 表に示した各種の細菌、放線菌を用いることおよび使用する坂口フラスコが 1 本であること以外は実施例 2 と同様な方法で培養、集菌した菌体を 0.1 mM ジチオスレイトールを含む 0.02 M リン緩カリ緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に懸濁後、超音波処理、遠心分離により上澄液を得た。このようにして得られた上澄液の蛋白含有量、KPL リダクターゼ活性および生成パントラクトンの D 体比率を測定し第 2 表を得た。

なお、上記上澄液を実施例 1 と同様に DEAE セフアセルの段階まで部分精製することにより、実施例 1 で得られた KPL リダクターゼとほぼ同等の酵素的性質を有する KPL リダクターゼを単離することができた。

第 2 表

生産菌	比活性 (U/mg 蛋白)	D (%)
エアロバクター・クロアカエ IAM 1221	0.142	98.7
セラチア・プリムチカム IFO 3055	0.134	93.4
アクロモバクター・ポリモルフ IFO 3160	0.081	95.8
フラボバクテリウム・スアペロレンズ IFO 3752	0.133	98.2
アグロバクテリウム・ツメファシエンズ IAM B-26-1	0.179	91.3
マイクロツカス・ルテウス IFO 3064	0.066	96.6
コリネバクテリウム・グルタミカス ATCC 13060	0.129	90.6
スタフィロツカス・オーレアス IFO 3060	0.177	92.5
アルスロバクター・グロビフォルミス IFO 12137	0.120	97.9
ブレヴィバクテリウム・インセルタム IFO 12145	0.090	93.5
アシネトバクター・カルコアセテイカス IAM 1517	0.179	94.2
シュードモナス・シリリガエ IFO 12655	0.082	96.6

キサントモナス・キヤムベストリス IAM 1671	0.185	94.1
------------------------------	-------	------

実施例 6

第 3 表に示した各種のカビを用いることおよび使用する坂口フラスコが 1 本であること以外は実施例 3 と同様な方法で集菌培養した菌体を 0.1 mM ジチオスレイトールを含む 0.02 M リン緩カリ緩衝液 (pH 7.0) 20 ml に懸濁後、ガラスビーズ処理により菌体を破碎し、遠心分離によつて不溶物の除去を行ない上澄液を得た。このようにして得られた各上澄液の蛋白含有量、KPL リダクターゼ活性および生成パントラクトンの D 体比率を測定し第 3 表を得た。

なお、上記上澄液を実施例 1 と同様に DEAE セフアセルの段階まで部分精製することにより、実施例 1 で得られた KPL リダクターゼとほぼ同等の酵素的性質を有する KPL リダクターゼを単離することができた。

第 3 表

生産菌	比活性 (U/mg 蛋白)	D (%)
リゾツプス・オリザエ IFO 5440	0.163	96.8
アスペルギルス・ニガー IFO 4343	0.116	95.1
ピソクラミス・フルバ IFO 7901	0.146	91.6
オーレオバジウム・ブルランズ IFO 4465	0.185	93.8

出願人 豊鉄化学工業株式会社
代表者 佐々木 浩

第1頁の続き

⑥Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
//(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:845)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:66)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:78)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:88)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:72)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:025)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:20)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:44)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:265)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:06)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:425)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:13)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:38)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:64)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:645)		6760-4B
(C 12 N 9/02		7236-4B
(C 12 R 1:01)		6760-4B

手続補正書(自発)

昭和59年4月16日

特許庁長官 若杉和夫殿



- 1 事件の表示
昭和59年特許願第046139号
- 2 発明の名称 ケトバントラクトンリダクターゼの製造方法
- 3 補正をする者
事件との関係 特許出願人
〒675-01 カユウ市マカシ
住所 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1
名称 製鉄化学工業株式会社
(TEL0794-37-2151)
代表者 佐々木 啓
4. 補正の対象 明細書
5. 補正の内容
(1) 明細書第4頁第6行を以下のとおり補正する。
「extractの段階において0.009uni
mg蛋白とかな」

(2) 明細書第6頁第13行「内に」を「固体内に」と補正する。

(3) 明細書第11頁第1行~第11行を以下のとおり補正する。

「320μM NADPH, 200mMリン酸カリ緩衝液(pH7.5)を含む水溶液2.5mlに酵素液5μlを加えて窒素雰囲気下30℃で3分間放置して一定温度とした後、100mM KPL溶液を10μl加えて反応を開始させ、340nmの吸光初期減少をスペクトロメーター(日立Model 200-10 spectrometer)で測定することにより、酵素活性を測定した。

KPLリダクターゼ酵素活性は1分間に1μmolのNADPHを消費する酵素量を1単位(U)とする。

(2) 蛋白量の定量

Bovin serum albumin(BSA)を標準とする」

(4) 明細書第11頁第17行「2ml」を「2μl」と補正する。

(5) 明細書第14頁下より第2行「CL-48」を「CL-4B」と補正する。

(6) 明細書第18頁第1表、第2行および第3行の「0.07g」「0.13g」をそれぞれ「0.078」「0.138」と補正する。