

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭60-188064

⑬ Int. Cl.⁴
C 12 N 9/02

識別記号 庁内整理番号
7236-4B*

⑭ 公開 昭和60年(1985)9月25日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全9頁)

⑮ 発明の名称 イサチンリダクターゼならびにその製造方法

⑯ 特 願 昭59-46140

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

⑲ 発 明 者 畑 啓 之 加古川市上荘町国包189-1

⑳ 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 イサチンリダクターゼならびにその製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) イサチンを NADPH の存在下に還元するイサチンリダクターゼ。
- (2) 1モルのイサチンと1モルの NADPH より1モルのジヒドロキシインドールおよび1モルの NADP⁺ を生成する特許請求の範囲(1)記載のイサチンリダクターゼ。
- (3) 至適 pH が 6.0~8.0 特許請求の範囲(1)記載のイサチンリダクターゼ。
- (4) 30℃、10分間の保持条件において比較的安定な pH 範囲が 6.5~8.0 である特許請求の範囲(1)記載のイサチンリダクターゼ。
- (5) ゲル濾過法により測定した分子量が 31,000 ± 3,000 である特許請求の範囲(1)記載のイサチンリダクターゼ。
- (6) 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

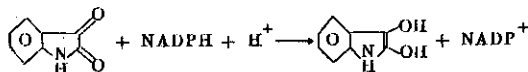
ラ属、グリオクラジウム属、オーレオバシジウム属、フィットフトラ属、シリンドカルボン属、ピソクラミス属、ピチア属、ハンセヌラ属、シュバニオマイセス属、デバリオマイセス属、スポロボロマイセス属、サッカロマイセス属、クリプトコッカス属、トルロブシス属、キャン^テイダ属、トルラ属、ロドトルラ属、トリコスポロン属、シゾサッカロマイセス属、シテロマイセス属、エンドマイコブシス属、トラメテス属、ピシノボラス属、アグロバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エアロバクター属、アクロモバクター属、フラボバクテリウム属、スタフィロコッカス属、マイクロコッカス属、アルスロバクター属、プレバクテリウム属、シュードモナス属、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に属するイサチンリダクターゼ産生菌を栄養培地で培養して菌体内にイサチンリダクターゼを蓄積せしめ、該菌体からイサチンリダクターゼを採取する

ことを特徴とするイサチンリダクターゼの製造方法

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規な酵素であるイサチンリダクターゼならびにその製造方法に関する、代謝経路においてイサチンはジヒドロキシインドールの酸化生成物として得られることは知られているが、イサチンからジヒドロキシインドールへの還元反応に関与する酵素の報告はない。本発明者らは微生物の広範なスクリーニングの結果、イサチンの還元に関与する微生物が自然界に広く存在することを知り本発明に至った。

即ち本発明のイサチンリダクターゼは下記の反応に触媒する。



本発明において単離により得られたイサチンリダクターゼはNADPHを水素供与体としてイサチンを還元した。この際イサチンとNADPHが当量比で反応が進んだ。また、この反応の逆反

応は全く進まないこと、さらにNADPHのかわりにNADHを用いると、その反応速度が2%以下ときわめて遅いこともあり、本酵素はイサチンとの組み合わせによりNADPHの定価に利用出来ることがわかった。

本発明の要旨は、イサチンをNADPHの存在下に還元するイサチンリダクターゼならびにムコール属、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、ハンセヌラ属、シュバニオマイセス属、デバリオマイセス属、スポロボロマイセス属、サッカロマイセス属、クリプトコッカス属、トルロブシス属、キャンディダ属、トルラ属、ロドトルラ属、トリコスボロン属、シゾサッカロマイセス属、シテロマイセス属、エンドマイコブシス属、トラメテス属、ピシノボラス属、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、スタフィロコッカス属、ミクロコッカス属、アルスロバクター属、ブレビバクテリウム属、シュードモナス属、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に属し、該当生物菌体内にイサチンリダクターゼを産生する能力を有する微生物を栄養培地で培養して菌体内にイサチンリダクターゼを蓄積せしめ、次いで当該菌体よりイサチンリダクターゼを採取することを特徴とするイサチンリダクターゼの製造方法である。

本発明においてイサチンリダクターゼ産生菌として用いられる微生物は前記のいずれかの属に属し、菌体内にイサチン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、ムコールサブティリシマス IFO 6888、リゾプス・オリザエ IFO 5440、アスペルギルス・ニガー IFO 4843、ペニシリウム・クリングナム IFO 4626、フザリウム・クルモラム IFO 5902、ジベレラ・フジクロイ IFO

6856、グリオクラジウム・デリグネセンス IFO 6617、オーレオバシジウム・ブルランス IFO 4465、フィトフトラ・インフェスタンス IFO 4872、シリンドカルボン・デストラクタンズ IFO 5998、ピソクラミス・フルバ IFO 7901、ピチア・ファリノサ IFO 0193、ハンセヌラ・アノマラ IFO 0569、シュバニオマイセス・オクシデンタリス IFO 0871、デバリオマイセス・ハンセニル IFO 0794、スポロボロマイセス・ホルサティカス IFO 1032、サッカロマイセス・ファメンタティ IFO 0422、クリプトコッカス・ネオフォーマンス IFO 0410、トルロブシス・キャンディダ IFO 0380、キャンディダ・パラブシロシス IFO 0708、トルラ・ヘルバルム IFO 9500、ロドトルラ・ミスタ IFO 0920、トリコスボロン・キャピティウム IFO 0748、シゾサッカロマイセス・ボンベ IFO 0346、シテロマイセス・マトリテンシス IFO 0964、エンドマイコブシス・ビスボラ IFO 0808、トラメテス・サンギネア IFO 6492、ピシノボラス・コシネウス IFO 9768、アグロバ

クテリウム・ツメファシエンズ IFO 18264, コリネバクテリウム・アクアティウム IFO 12154, エアロバクター・クロアカエ IAM 1221, 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, スタフィロコッカス・オーレアス IFO 3060, ミクロコッカス・ルテウス IFO 3064, アルスロバクター・グロビフォルミス IFO 12140, プレミバクテリウム・リネンス IFO 12141, シュードモナス・シンシアネア IFO 3757, キサントモナス・キャンベストリス IFO 18551, マイコバクテリウム・アビウム IFO 3154, セラチア・プリムチカム IFO 3055, アシネトバクター・カルコアセティカス IAM 1517 などが挙げられる。またこれらの菌の天然及び人工変異菌であってもイサチン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って、まず前記のイサチン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表面培養でもよいが、

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、石英砂等での撹拌処理、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み合わせることによって菌体内よりイサチン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って粗製のイサチンリダクターゼ含有液が得られる。

次いでこの粗製イサチン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、精製されたイサチン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、必要に応じ適宜組合わせて用いられる。

かくして得られるイサチンリダクターゼはイサチンを NADPH の存在下に還元し高い比活性を有して

工業的にはイサチン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イサチン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 8～10 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、イサチンリダクターゼの活性が最高に達する時期をみはからっ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、イサチン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イサチンリダクターゼを抽出し、粗製のイサチン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

いることから、臨床用検査試薬や研究用試薬として有用である。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、実施例中の多はとくに断りのないかぎり重量基準であり、またイサチンリダクターゼの酵素活性測定法や物性測定法は以下の通りである。

(1) 酵素活性測定法

320 μ M 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 5 μ g を加えて窒素雰囲気下 30℃ で 8 分間放置して一定温度とした後、100 mM イサチン溶液を 10 μ l 加えて反応を開始させ、340 nm 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。イサチンリダクターゼ酵素活性は 1 分間に 1 μ mol の NADPH を消費する酵素量を 1 単位 (U) とする。

(2) 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。

(8) PH 安定性

0.02 M 緩衝液 1.9 ml に酵素液 5 μ l を加えて窒素雰囲気下 80 $^{\circ}$ C で 80 分間放置したのち、10 mM の NADPH 溶液 0.08 ml および 1 M グルコン酸カリ緩衝液 (PH 7.5) 0.5 ml を加えさらに (1) と同様にして残存酵素活性を測定する。なお最初に用いた緩衝液の内 PH 8 ~ 6 はクエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液、PH 6 ~ 8 はリン酸カリ緩衝液、PH 8 ~ 10 はグリシン-苛性ソーダ緩衝液である。

(4) 至適温度

(1) の酵素活性測定法で温度を変化させ、その至適 PH を求める。

(5) 熱安定性

10 $^{\circ}$ C ~ 80 $^{\circ}$ C の温度で 10 分間 酵素液を処理し、その残存活性を測定する。

(6) Km 値

イサチン、NADPH に対する Km 値を測定する。

(7) 分子賦

セファデックス G-100 ゲル濾過法により測定する。

実施例 1

麦芽エキス 5%、酵母エキス 0.8%、寒天斜面培地 (PH 6.0) で 28 $^{\circ}$ C、48 時間培養したキャンディグ・パラプロシス IFO 0708 の一白金^耳種と、麦芽エキス 5%、酵母エキス 0.8% からなり PH 5.0 に調整、加熱滅菌した液体培地 5 ml、8 本に接種し、28 $^{\circ}$ C で 48 時間振盪培養した。次に細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接種し、28 $^{\circ}$ 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、超音波処理によりイサチンリ

ダクターゼを抽出し、遠心分離によっ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最終濃度 80% 飽和になるように加え、イサチン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 0.1 mM ジチオスレイトールを含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (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) に通してイサチンリダクターゼを吸着させ、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イサチンリダクターゼを溶出させた。溶出されたイサチンリダクターゼ活性^{成分}を求め、

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) に通してイサチンリダクターゼを吸着させ、同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液 (4 M 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、イサチンリダクターゼを溶出させた。溶出されたイサチンリダクターゼ活性^{成分}を集め、90% 飽和硫酸アンモニウムで沈澱してくるものを 2 ml の 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) に溶解し、同緩衝液で平衡化したセファデックス G-75 カラムにてゲル濾過を行い、イサチンリダクターゼ活性^{成分}を集め、90%

飽和硫酸アンモニウムで沈澱してくるものを1 mlの0.1 mMジチオスレイトールと0.02 Mのリン酸カリ緩衝液 (PH 7.0) に溶解し、さらにポリエチレングリコールを添加して1夜放置し、イサチン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、イサチンリダクターゼ標品 5 mgを得た。この酵素の水溶液 5 μ l (蛋白 1 μ g 相当) を用いて酵素の活性を測定したところ、このものの比活性は 254 U/mg、培養液からの収率は 14.6%であった。至適 PH は 第 1 図に示すごとく 7.0~7.5 であり、PH 安定性は第 2 図に示すごとく 6.0~8.0 の範囲が好ましく至適温度は第 3 図に示すごとく 40 とないし 50 との範囲であった。また熱安定性は第 4 図に示すごとく 30 と以下、イサチン、NADPH に対する K_m 値はそれぞれ 14 μ M、0.12 mM であった。さらに分子量は 31,000 \pm 3,000 と求められた。

実施例 2

アグロバリテリウム・ソメファシエンス I

ガラスビーズ処理により菌体を破砕し、遠心分離によっ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、イサチンリダクターゼ標品 7 mg を得た。

このものの比活性は 255 U/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 の場合とほぼ同等であった。

実施例 4

第 1 表に示した酵母担子菌を用いること及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 0.1 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) 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イサチンリダクターゼの比活性を測定し第 1 表に示した。なお、上記上澄液を実施例 1 と同様に精製することにより、実施例 1 の DEAE・セファセルの段階まで精製して実施例 1 のイサチン

FO 18264 の 1 白金有量をグルコース 5%、コーンスチープリッカー 8%、炭酸カルシウム 1% からなり PH 7.0 に調整、加熱滅菌した液体培地 5 ml、3 本に植菌し 28℃ で 48 時間培養した。次にこの培養液を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 本にそれぞれ植菌し 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 と同様に処理してイサチンリダクターゼ標品 6 mg を得た。

このものの比活性は 268 U/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 の場合とほぼ同等であった。

実施例 3

実施例 1 で示した培地 500 ml でアスペルギルス・ニガー IFO 4348 を 2 日間培養して得られた培養液 40 本より濾過により得られた菌体を 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) 800 ml に懸濁後

リダクターゼとほぼ同等の酵素的性質を有するイサチンリダクターゼを単離することができた。

第 1 表

生産菌	比活性 (U/ml)
ピチア・ファリノサ	IFO 0193 4.59
ハンセヌラ・アノラマ	IFO 0569 3.90
シュバニオマイセス・オキシデンタリス	IFO 0871 2.89
デバリオマイセス・ハンセニル	IFO 0784 2.69
スポロボロマイセス・ホルサティカス	IFO 1032 4.60
サッカロマイセス・ファメントイ	IFO 0422 2.01
クリプトコッカス・ネオフォーマンズ	IFO 0410 2.37
トルロプシス・キャンディダ	IFO 0380 4.35
キャンディダ・パラブシロス	IFO 0708 3.84
トルラ・ヘルバルム	IFO 9500 3.63
ロドトルラ・ミヌタ	IFO 0920 4.47
トリコスボロン・キャピタム	IFO 0743 2.51

シゾサッカロマイセス・ボンベ	IFO 0846	4.18
シテロマイセス・マトリテンシス	IFO 0954	4.80
エンドマイコプシス・ビスボラ	IFO 0808	2.78
トラメテス・サンギネア	IFO 6492	2.49
ピシノボラス・コンネウス	IFO 9768	2.76

実施例5

第2表に示した細菌、放線菌を用いること及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0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH 7.0)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イサチンリダクターゼの比活性を測定し第2表に示した。

なお、上記上澄液を実施例8と同様にして部分精製することにより、実施例1で得られたイサチンリダクターゼとほぼ同等の酵素的性質を有するイサチンリダクターゼを単離することができた。

セラチア・プリムチカム	IFO 8055	4.97
アンネトバクター・カルコアセティカス	IAM 1517	3.61
マイコバクテリウム・アビウム	IFO 8154	3.96

実施例6

第3表に示したカビを用いること及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8と同様な方法で集菌培養した菌体を0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH 7.0)20mlに懸濁後、ガラスビーズ処理により菌体を破砕し、遠心分離によっ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イサチンリダクターゼの比活性を測定し第3表に示した。

なお、上記上澄液を実施例8と同様にして部分精製することにより、実施例1で得られたイサチンリダクターゼとほぼ同等の酵素的性質を有するイサチンリダクターゼを単離することができた。

質を有するイサチン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/ml)	
アグロバクテリウム・ツメファシエンシス	IFO 18264	4.99
コリネバクテリウム・アクアティクム	IFO 12154	3.58
エアロバクター・クロアカエ	IAM 1221	4.72
アクロモバクター・ポリモルフ	IFO 3160	4.96
フラボバクテリウム・スアベロレンズ	IFO 8752	2.28
スタフィロコッカス・オーレアス	IFO 8060	3.18
ミクロコッカス・ルテウス	IFO 8064	4.97
アルスロバクター・グロビフォルミス	IFO 12140	4.71
プレビバクテリウム・リネシス	IFO 12141	3.98
シュードモナス・シンシアネア	IFO 3757	3.70
キサントモナス・キャンベストリス	IFO 13551	4.61

第3表

生産菌	比活性 (U/ml)	
ムコール・サブティリシマス	IFO 6888	3.56
リゾプス・オリザエ	IFO 5440	2.52
アスペルギルス・ニガー	IFO 4843	3.74
ペニシリウム・クリソゲナム	IFO 4626	2.91
フザリウム・クルモラム	IFO 5902	4.49
シペレラ・フジクロイ	IFO 6856	4.74
グリオクラジウム・デリグネセンス	IFO 6617	3.68
オーレオバシジウム・ブルランス	IFO 4465	4.26
フィトフトラ・インフェスタンス	IFO 4872	4.75
シリンドカルボン・デストラクタンス	IFO 5998	2.48
ピソクラミス・フルバ	IFO 7901	2.08

4. 図面の簡単な説明

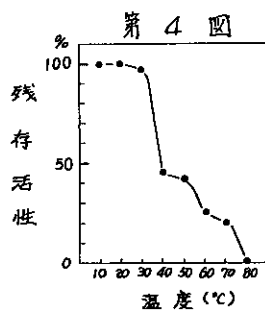
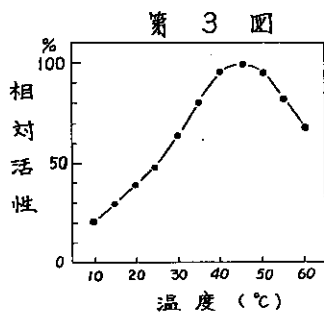
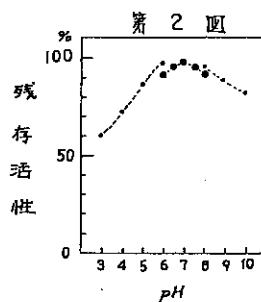
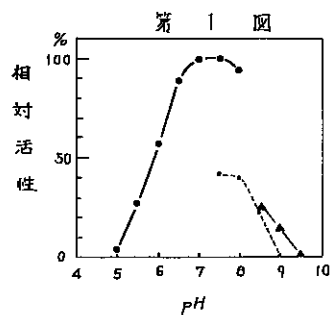
第1図は本発明酵素の至適pH範囲を示す。

第2図は本発明酵素の安定pH範囲(30と10分)を示す。

第3図は本発明酵素の至適温度範囲を示す。

第4図は本発明酵素の安定温度範囲を示す。

出願人 製鉄化学工業株式会社
 代表者 佐々木 彦



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	1:785)	6760-4B
(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	1:80)	6760-4B
(C	12 N	9/02	7236-4B
(C	12 R	1:77)	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	1:84)	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	1:85)	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	1:15)	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	1:425)	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	1:44)	6760-4B

⑥Int. Cl. ⁴		識別記号	庁内整理番号
(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	1:13)	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	1:01)	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046140号
2. 発明の名称 イサチンリダクターゼならびにその製造方法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

〒675-01 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 浩

4. 補正の対象 明細書
5. 補正の内容
(1) 明細書第3頁下より第2行「イサチンこと」を「イサチンと」と補正する。
(2) 明細書第5頁第16～17行「ムコールサブ ティリシマス IFO 6338.」を「ムコール・サ

特開昭60-188064(9)

アティリシマス IFO 6338.」と補正する。

(3) 明細書第15頁末行「ツメファシェンス」を「ツメファシェンス」と補正する。

(4) 明細書第16頁下より第2行「0.1μM」を「0.1mM」と補正する。

