

平成2年度
酵素工学コース
帰国研修員フォローアップチーム報告書
(中国、タイ)

平成3年3月

国際協力事業団
大阪国際研修センター

大阪セ

JR

91-04

5
8
C

国際協力事業団

23405

JICA LIBRARY



1096509(3)

23405

序 文

国際協力事業団は大阪市立工業研究所の協力を得て、昭和53年度から平成2年度まで過去12回（昭和54年度は休止）に亘って、開発途上国において酵素工学の研究に従事する研究者・技術者を対象に、酵素工学研修コースを実施してきた。この間、本分野を含むバイオテクノロジー分野の発展は目覚しく、ますます高度化・多様化してきた。他方、本コースの修了者はすでに61名に達し、帰国研修員の活動状況を把握し、併せて、最近のニーズを聴取し、さらに帰国研修員を中心とした当該国の本分野の専門家に、わが国における本分野の最新の技術情報を提供するため、公開技術セミナーチームを帰国研修員フォローアップ事業の一環として派遣することとなった。このため中国およびタイ国に調査団を派遣した。

調査団は両国で公開技術セミナーを実施したほか、関係機関を訪問し、意見交換を行ない、併せて帰国研修員の活動状況を調査した。

本報告書は、今回の調査団の活動をまとめたものであるが、関係者のご参考に資すれば幸甚に存じます。

なお、本件の実施に際し、ご助力を賜りました内外の各関係者の方々に、改めて謝意を表す次第です。

平成3年3月1日

国際協力事業団

大阪国際研修センター

所長 八 島 継 男

目 次

I 公開技術セミナー調査団派遣の概要	1
1. 公開技術セミナー調査団派遣の経緯と目的	1
2. 調査団員	1
3. 日 程	1
II 調査内容及び調査方法	3
1. 調査内容	3
2. 調査方法	3
III 調査所感	3
1. 酵素工学関係機関の視察	3
2. 帰国研修員との面談	8
3. コース改善への提言	21
IV 公開技術セミナーの開催	23
1. 公開技術セミナーの概要	23
(1) テーマおよび講演者	23
(2) 日時、場所および参加者	23
① 中 国	23
② タイ国	24
2. 公開技術セミナーに対する所感	24

添付資料

1. 公開技術セミナー配布資料（日本語、英文、中国語）
2. 帰国研修員リスト
3. 国別受入者数

I 公開技術セミナー調査団派遣の概要

1. 公開技術セミナー調査団派遣の概要

酵素工学研修コースは大阪市立工業研究所（以下市工研と略す）を受入機関として、昭和53年（'78）から平成2年度（'90）までに合計12回実施し、計61人の研修員を受入れた。この間、当該分野の技術はバイオテクノロジーを含め著しく進歩し、多様化してきた。今や分子遺伝子レベルへと深化するとともに食品、医薬品から環境分野まで、その応用範囲は拡大を続けている。

本コースは平成2年度（'90）で12年目を迎え、修了者も61名に達したので、第1回のフォローアップ調査団を派遣することとした。また、本調査団は同時に、近年のわが国において著しく進歩している酵素工学の現状を紹介する、公開技術セミナーを実施した。

対象国としては、昭和53年（'78）の第1回から参加し、平成2年までに13名を受入れたタイ国および昭和56年（'81）の3回目から参加し、平成2年までにタイに次ぐ10名を受入れた中国を採り上げた。

本調査はこの二国を対象とし、以下の目的をもつものである。

- 1) 本コースの帰国研修員及びその関係者との面接、帰国研修員の勤務先の視察を通じて、本コースの成果の適用度を調査・評価して、コースの改善に資する。
- 2) 訪問国の酵素工学研究と産業分野での活用の実態を調査し、本コースに対するニーズを把握し、コース運営の参考とする。
- 3) わが国の酵素工学に関する最新情報を提供し、対象国の酵素工学分野の向上に資する。

本研修コースは本来「開発途上国において、酵素工学ないし、発酵工学に関する業務または研究に従事する技術者に対し、講義と実験を通じ、微生物及び酵素に関する一般的な知識と技術を習得するとともに、見学を通じ日本におけるその広範な応用ぶりを紹介し、参加国における当該分野の知識と技術の向上を図ることを目的として設定されたものであるので、今回の調査を通じ、これがどこまで実現しているのか、また、こうしたことを実現するうえでの、コースの内容の改善余地は何かを探るものである。

同時に当該分野の「公開技術セミナー」を実施し、最近のテーマについて講義した。

2. 調査団員

- (1) 総括：大江達彦 大阪市立工業研究所 生物化学課 研究主任
- (2) 酵素工学：室 哲雄 " "
- (3) 業務調整：橋本文成 国際協力事業団大阪国際研修センター 研修課

3. 日 程

平成2年12月3日(月)から平成2年12月16日(日)

日程(案)

日順	月日	曜日	行 程
1	12月3日	月	大 阪 (7:30) - ANA 76 - (8:35) 成 田 成 田 (10:30) - ANA 905 - (13:55) 北 京
2	4	火	(AM) 日本大使館、中国国家科学技術委員会表敬、JICA事務所 打合せ (PM) 北京醸酒総合工場、北京発酵工業研究所、北京東 部ぶどう酒廠
3	5	水	(AM) 帰国研修員面接(4名) (PM) セミナー開催、懇親会
4	6	木	北 京 (16:45) - MU5144 - (18:35) 上 海
5	7	金	(AM) 上海→無錫(車) (PM) 無錫軽工業学院視察
6	8	土	(AM) 無錫→上海(車)
7	9	日	資料整理
8	10	月	(AM) 帰国研修員面接(4名) (PM) セミナー開催、懇親会
9	11	火	上 海 (14:10) - MU509 - (16:20) 香 港 香 港 (18:05) - TG633 - (19:45) バンコク
10	12	水	(AM) 日本大使館、DTEC表敬、JICA事務所打合せ (PM) 帰国研修員面接
11	13	木	(AM) 帰国研修員面接 (PM) セミナー開催、懇親会
12	14	金	(終日) 大学省、カセサート大学、タイ科学技術研究所視察
13	15	土	(AM) 科学技術エネルギー省視察
14	16	日	バンコク (10:40) - TG620 - (19:55) 大 阪

II 調査内容及び調査方法

1. 調査内容

調査内容は、主として以下のとおり。

- (1) 研修コースに対する評価、意見及び要望
- (2) 研修コースで得られた知識の運用度及び波及効果
- (3) 対象国の酵素工学研究及び産業界における酵素工学応用事業の実状と問題点

2. 調査方法

- (1) 対象国の酵素工学研究機関及び応用事業所の視察
- (2) 帰国研修員及び関係者との面接、懇談
- (3) 質問状の配布・回収
- (4) 関連資料の収集

III 調査所感

1. 酵素工学関係機関の視察

往訪した各機関とも本研修コースに対する評価は非常に高いものがあった。とくに最近の世界
的なバイオテクノロジーブームにマッチするものとして、各機関とも今後の継続はもとより、い
っそうの拡充をという強い要望が出された。

とりわけ、この両国とも、最近の経済発展は目覚しく、それにつれ、人々の生活向上への欲求
は強く、それはとりもなおさず食品に対する嗜好の多様化、医薬品の性能向上等へのニーズの強
さを意味し、これらに対する本コースの役割に強い期待が示された。

視察先各機関に関する概要及び調査団が得た印象の詳細（活動状況及び機器整備状況等）につ
いては次のとおりである。

(1) 中 国

1) 北京市発酵工業研究所 (12/4)

所在地： Jian Guo Avenue East Suburbs, Beijing, China

① 概 要

施副所長より出席者の紹介と発酵工業研究所の紹介が為された。

本研究所は1961年に設立、ここでは、ビール、白酒、ぶどう酒などの酒類や有機酸など
食品発酵工業の育成のために技術開発を進めている。全職員83名でそのうち研究職員は
その約70%である。

② 主要設備

- ・ ジャーファメンタ 丸菱製
- ・ 液体クロマトグラフィー
- ・ 細胞破砕器
- ・ 低温室（故障中）
- ・ 培養室（振とう器はなし）
- ・ 限外濾過による濃縮装置

③ 所 感

全体的に実験設備はかなり貧弱であり、既存の機器整備状況では、通常の研究遂行はかなり困難と思われた。

実験台の上には、ガラス器具等がほとんど置かれておらず、実験をしている気配もあまり感じられなかった。

研究所からは「現在更生中である」とのコメントがあったが、全体的に活動が停滞している印象は否めなかった。

2) 北京醸酒総合工場 (12/4)

所在地： Jian Guo Rd. Chao Yang Distriet, Beijing 100022, China

① 概 要

任高級エンジニアより出席者の紹介と醸酒総合工場の紹介が為された。本工場は1965年に年に設立、全職員260名でそのうち技術者は約45%である。主な酒は、焼酎である。ここでの主な仕事は、①生産と経営、②業界へのサービス、③酒の品質、検査、監督などである。

なお、本視察先は概要説明のみであり、実験施設等の視察はなかったため、特に所感はない。

3) 北京東郊ワイン工場 (12/4)

所在地： jian Guo Rd. Jian Guo Men Wai Beijing, China

① 概 要

張工場長より出席者の紹介とワイン工場の紹介が為された。本工場は、約700名の職員からなり、各種のワインやブランデーを生産している。そのうちのいくつかは、おもに東南アジア、ヨーロッパ、北アメリカへ輸出されている。

② 所 感

ドイツ製の新型おどろ破砕器が稼動している上、20トン発酵タンクおよび貯蔵タンク等、生産に必要な機器は充分揃っていた。ただし、ブランデー製作工程の蒸留装置の制御は、工員の経験と勘で行われていた。

その他、ビンづめ工程においては、充填後の内容量がまちまちであったり、栓が完全に

なかったりと、あまりスムーズではなかった点もみうけられた。

4) 無錫軽工業学院(12/7)

所在地： Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi, Jiangsu, China

① 概 要

無錫軽工業学院の前身は、南京工学院食品工業部で、1958年、現在の名称となった。本学院は、発酵工学部、食品科学工学部など10学部からなり、今回は、JICAの元研修員の張氏の属している発酵工学部を視察した。

② 主要設備

(中央研究所) ※各学部共通で利用

- ・GC-MS EI-CI 日本電子
- ・MMR 90MHz 日本電子
- ・液体クロマトグラフィー パッカード ウォーターズ 3台
- ・ガスクロマトグラフィー 島津 GC-14A
- ・イオンクロマトグラフィー IC LAB製
- ・蛍光分光光度計 HITACHI 650-60
- ・アミノ酸分析計 HITACHI 835
- ・原子吸光 パーキンエルマ製
- ・赤外分光 2台 ニコレット製50XC HITACHI IR400
- ・電子顕微鏡 HITACHI H-7000
- ・走査型電子顕微鏡 明石製作所 ISI-SX-40

(発酵工学部)

- ・フラクションコレクター ファルマシア製 LKB製
- ・クロマトスキャナー
- ・ホモジナイザー
- ・液クロモニター
- ・電気泳動装置 ファルマシア製
- ・遠心器 HITACHI製 SCR20BC
- ・超遠心器 HERAEUS-CHRIST (型が古い)
- ・グラジエント作成装置
- ・ジャーファメンタ 251 自動制御 中国製
- ・実験用ミニジャーファメンタ
- ・恒温室(培養室)
- ・低温室

③ 所 感

視察先であった各学部共通利用の中央研究所と発酵工学部の2ヶ所に限って言えば、実験設備はかなり豊富に整備されており、生化学の研究には問題はなく、実際かなり活発に実験もおこなわれているようだった。これら機器は、独自予算での購入というよりも、主として国際機関からの供与品で占められており、援助の取りつけと有効利用に長けた機関であるとの印象をうけた。ただし、液体クロマトグラフィーのような汎用の分析機器の数が少なすぎるのが気になった。

その他、新しい機器でも、故障のためカバーがかぶせられているものもあった。全体的には無難に実験は遂行されているようだった。

(2) タ イ

1) タイ科学・技術・エネルギー省 タイ科学技術研究所(12/14)

所在地： 196 Phahonyothin Road, Bangkok 10900, Thailand

電話：5791121-30

① 概 要

本タイ科学技術研究所は、タイ科学・技術・エネルギー省に属している。その研究部門は、それぞれ4つのセクションからなる3グループと特別技術グループからなる。今回は、前者のグループのうち第1グループに属するバイオテクノロジー課と化学工業課とを視察した。

両課での主たる研究内容は、アルコール発酵(キャッサバ→グルコース→アルコール)、微生物が生産する殺虫剤、スパイス、微生物試験等である。

② 主要設備

- ・冷却遠心器
- ・ジャーファメンタ NBS製
- ・ミニジャーファメンタ NBS製
- ・フランキー
- ・嫌気性菌培養用ボックス
- ・フラクションコレクター
- ・オートクレイブ
- ・アルコール発酵のパイロットプラント
- ・ガスクロマトグラフィー (極めて古い型)
- ・光電比色計
- ・凍結乾燥器

③ 所 感

培養装置は、一応一通り揃っていた。ただし酵素を取り扱うための装置器具は少なく、

機器も旧型が多かった。

2) カセサート大学 (12/14)

所在地： Bangkhen, Bangkok 10900, Thailand

① 概要

Ms. Vilai (1985年度) がアシスタントプロフェッサーをしている、本大学の理学部微生物学科を視察した。同科の陣容は、先生24名、学生35名、大学院生10名である。同科で実施されている主たる研究内容はキャッサバなどに含まれる多糖の加水分解酵素、酵素の精製や性質を用いたいい香りの開発、アルコール発酵、プロテアーゼ等である。

② 主要設備

- ・ ジャファメンタ
- ・ 冷却遠心器
- ・ ガスクロマトグラフィー simazu GC-9A
- ・ 分光光度計
- ・ クロマトチャンバー
- ・ フラクションコレクター
- ・ ミニジャーファメンタ
- ・ 電気泳動装置
- ・ 液体クロマトグラフィー
- ・ 温度勾配培養装置

③ 所感

微生物の培養および酵素の精製や性質を調べるための最低限の装置はそろっていた。微生物の加水分解酵素（特にキャッサバの有効利用）の研究が中心であるが、単なる応用だけでなく、たとえばキャッサバでんぷんの分解様式を調べるような解析的な研究もしている。機器類はUSAID（米国国際開発庁）からの供与品が、かなり見うけられた。

3) タイ厚生省 医科学局 食品分析部 (12/15)

所在地： Yod-se, Bangkok 10100, Thailand

① 概要

医科学局は、厚生省に属し、15の部から構成されている。今回は、2名のJICAの元研修員 (Ms. Phen, 1987, Ms. Sajee, 1988) が所属している食品分析部を視察した。仕事の大部分が、輸出および輸入の食品についての食品成分、添加物や残留農薬の分析である。

② 主要設備

- ・ GC-MS
- ・ 液体クロマトグラフィー (多数)

- ・ガスクロマトグラフィー（多数）
- ・紫外分光光度計（多数）
- ・赤外分光光度計（多数）
- ・原子吸光分析計
- ・アミノ酸分析計
- ・クロマトスキャナ
- ・電気泳動装置
- ・コンピューターシステム
- ・水銀分析計
- ・培養室
- ・遠心分離器

③ 所感

分析機器は日本のよく整備された研究所と遜色ない程、必要と考えられるものはすべて導入されている。

特に輸出食料品については輸入国の規制にあわせて添加物等の分析が必要であるので、設備に関しても輸入国の分析レベルにあわせている。従って、設備が優秀となっていると思われる。

ただし、食品分析部での分析業務は、ほとんどがルーティンワーク的分析業務であり、一部の職員は研究をやりたいと考えているが、分析部がもつ所掌の現状では困難である。

2. 帰国研修員との面談

本調査団では、帰国研修員の活動状況、および最新のニーズ、本コースへの希望等を把握するために、帰国研修員との面談を行った。各国の帰国研修員（中国10名、タイ13名）のうち、今回面談が可能だったのは中国5名、タイ12名であった。

特にタイにおいては、コースが開始された昭和53年度（1978年度）の第1回から、平成2年度（1990年度）の第12回までの全研修員13名のうち12名が集まり、欠席者は、昭和56年度（1981年度）参加のDr. Thanit 1名のみであった。同年度に関しては、タイから2名の参加があり、もう1名の参加者であったMrs. Siliratとは、我々との面談が可能であったので、結果として第1回目から第12回目までのすべての年度における研修の実状を把握することができ、とても貴重な意見交換ができた。

面談結果の詳細は次のとおり。

面談では主として①研修前の期待とその実現度 ②現在の仕事及び実績 ③現在の仕事に対する研修の効果 ④研修の改良点、の5項目について面接及び質問状を通じての意見聴取を行った。

(1) 中国

1) 張星元 Zhang Xing-yuan (1981年)

① 研修前の期待と実現度

期待 微生物生理学、微生物による酵素生産について

実現度 期間が短すぎた

専門知識の修得が困難であった。

② 現在の仕事および実績

現在の仕事

研究内容 アミノ酸発酵と酵素優良生産菌の育種

週4回”微生物の生育と栄養””遺伝学”について講義している
無錫輕工業学院発酵工学科中心実験室主任

1987年微生物学会発表

アミノ酸高生産菌の育種と基礎的研究

教科書の著作

微生物学(発酵工業への活用)第2版(1990年) 輕工業出版社

工業微生物生理および遺伝育種学 執筆中

③ 現在の仕事に対する研修の効果

3の講義を行うにあたってJICA研修で得た知識が少し役だっている。
研究には直接役だっていない

④ 研修の改良点(意見)

研修プログラムに応用研究を加えてほしい

2) 廬法章 Far-chang Lu (1982年)

① 研修前の期待と実現度

期待

発酵工業を研究するためにはそれに関係する酵素の研究を行わなければならぬ、そのための酵素の取扱いおよび知識を修得したかった。

実現度

現在各種のアミノ酸合成の研究を行っているが、その中でいくつかの酵素を取り扱っている。そこで研修で修得した酵素の知識および実験技術がたいへん役にたっている。

② 現在の仕事および実績

所属 中国 東北製薬工廠研究所

研修終了、帰国後研究室の室長になった。

酵素を用いたL-トリプトファンの合成

研修で得た知識並びに技術が部下の指導にたいへん役だった。

③ 現在の仕事に対する研修の効果

研修終了、帰国後研究室の室長になった。

研修で得た知識並びに技術が部下の指導にたいへん役だった。

④ 研修の改良点（意見）

固定化酵素並びに遺伝子操作を加えてほしい

（なぜならば、食品加工、医薬加工に用いる酵素はすべて輸入に頼っているが、非常に高いので、自国での開発をしたい。）

3) 楊萍 Yang Ping (1986年)

① 研修前の期待と実現度

期待

酵素研究の方法および基本的な研究手段の修得

実現度

酵素の生産、精製、性質の調べ方などを修得したので満足している。

期間が短すぎた

② 現在の仕事および実績

雲南微生物研究所 食品発酵研究室 研究員補

研修後グルコアミラーゼや α -アミラーゼの研究をしている。（主に応用

目的) ” 研修内容そのもの”

③ 現在の仕事に対する研修の効果

研修後グルコアミラーゼや α -アミラーゼの研究をしている。(主に応用目的) ” 研修内容そのもので、非常に役だっている。

将来酵素センサーの研究を行いたいと考えているが、そのときも研修で修得した知識が役立つと思う。

④ 研修の改良点(意見)

酵素および微生物の固定化、

微生物変異、遺伝子操作等が研修内容に含まれればさらによい。

4) 項 薛 Xiang Pei (1988年)

① 研修前の期待と実現度

期待

発酵工学および酵素工学について学びたい

実現度

特にグルコアミラーゼを用いた研修で自分の研究能力が向上した。

② 現在の仕事および実績

帰国後以下の研究を完了した

低アルコール飲料の濁りの除去

各種ワインの新製品の開発

③ 現在の仕事に対する研修の効果

上記の成果を得るにあたって自分で開発並びに分析ができるようになった。

しかし、研究設備が貧弱であるので酵素の研究はほとんどしていない。

④ 研修の改良点(意見)

アミラーゼ以外の酵素を対象にした研修プログラムを作ってほしい。

滴定以外の測定方法を取り入れてほしい。

5) 陳錦登 Jin-die Chen (1989年)

① 研修前の期待と実現度

期待

新しい知識情報等を得たかった。

実現度

基礎的知識は得ることができた。

しかし、応用(でんぷんのアクリルニトリルを用いた修飾)に直接結びつくような知識は多く得られなかった。

② 現在の仕事および実績

でんぷんのアクリルニトリルを用いた修飾

③ 現在の仕事に対する研修の効果

現在の仕事に研修で得た知識が役にたっている。

④ 研修の改良点(意見)

自分の仕事に関連する内容のものがあれば参加したい。

研修内容については今のままでよい。

(2) タイ

1) Jiraporn Sukhumavasi (1979)

① 研修前の期待と実現度

期待

酵素研究法、たとえば、酵素活性測定法やその性質などの調べ方について新しい知識を獲得したかった。

実現度

酵素工学全般にわたる知識を得るには6カ月という期間は短すぎる。

しかし、この研修期間中、ペプチダーゼの精製とその性質を調べることによって得た知識は、帰国後、自分の研究(学位の取得など)や部下の指導、育成に非常に役にたった。

② 現在の仕事および実績

バイオテクノロジー部門に属する発酵工学研究室の指導者として、バクテリアとカビのセルラーゼの生産プロジェクトの推進、微生物アッセイ法の開発に取り組んでいる。

帰国後、JSPS-NRCT Cooperative Programs と National Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Thailand との支援のもとで、名古屋大学に年間2～3カ月間、5年間留学し、学位を取得した。その論文名は、“高セルラーゼ嫌気生産菌の検索とそのセルラーゼ遺伝子のクローニング”である。

③ 現在の仕事に対する研修の効果

現在の仕事（工業的に重要なグルコアミラーゼ、セルラーゼなどの酵素の生産）に研修で得た知識が非常に役にたっている。

④ 研修の改良点（意見）

研修内容については今のままでよいが、より新しい分析方法を取り入れたほうがよい。

2) Metanee Sukontarug (1980)

① 研修前の期待と実現度

期待

農業生産物および工業廃棄物の利用のための知識を得たかった。

実現度

基礎的知識ならびに技術を得ることができて満足している。

また、研修で得た技術や知識が、帰国後、バクテリアの生産するアミラーゼの研究に従事したとき非常に役にたった。

② 現在の仕事および実績

Thai Industrial Standards Institute において、食品の規格に関する情報や分析に従事している。

帰国後、研修で得た技術や知識が、帰国後、バクテリアの生産するアミラーゼの研究に従事したとき非常に役にたった。また、配置替え後、Food Export Inspection において、1週間研修を受けた。

③ 現在の仕事に対する研修の効果

現在事務部門にいるが、研修で得た知識は役にたっている。

④ 研修の改良点（意見）

研修内容については今のままで充分である。

3) Sirirat Sarawek (1981)

① 研修前の期待と実現度

期待

酵素工学、微生物工学における新しい技術と情報の獲得ならびに酵素の工業的利用について学びたかった。

実現度

研修期間中、*Asp. niger* のエステラーゼを対象に、その精製と性質とを検討し、酵素研究法の基礎的技術や知識をえることができ満足している。

② 現在の仕事および実績

チェンマイ大学、化学の講師で、Enzyme Technology Course を受け持ち、特に、リパーゼとセルラーゼについて講義と実験の指導を行っている。

研究実績（報文）

1) Production of cellulase in a solid culture by *Aspergillus* sp.

ICME, V.6, 1983

2) Cellulase production from *Trichoderma viride* TISTR 3161 in a

solid medium. X Conf. Sci. Soc., Thailand, 1984

帰国後、植物起源の酵素の活性化および阻害について研究し、イギリスの大学より学位を取得した。

③ 現在の仕事に対する研修の効果

チェンマイ大学で、Enzyme Technology Course を受け持ち、学生や大学院生への講義やアドバイス等に極めて役にたっている。

④ 研修の改良点（意見）

長期間（6カ月）と短期間（1～2カ月）の2つの研修コース組むと良い。すでに、コースと同じ分野で経験のある人には、短期間コースが適している。

4) Molsiri Veerothai (1982)

① 研修前の期待と実現度

期待

酵素生産菌の検索から酵素の精製およびその性質について学びたかった。

実現度

研修期間中、*Asp. niger* のエステラーゼを対象に、その精製と性質とを検討し、酵素研究法の基礎的技術や知識をえることができて満足している。ただし、期間が短すぎるため酵素生産菌の検索ができなかったのが残念であった。

② 現在の仕事および実績

スリナカリンウィロ大学 理学部家政学科 講師

植物栄養学の講義を受け持っている。

オーストラリア、University of New South Wales に5年間留学。

バクテリア溶菌酵素による腐敗防止の研究によって学位を取得した。

③ 現在の仕事に対する研修の効果

スリナカリンウィロ大学で、食品科学に関与する酵素ならびに食品栄養について担当し、学生や大学院生への講義に役にたっている。

④ 研修の改良点（意見）

見学、視察等に時間が取られたため、研修期間がより短く感じられた。

帰国後も、最新の情報の提供などで研修員のフォローをしてほしい。

5) Aree Shuvisitkul (1983)

① 研修前の期待と実現度

期待

酵素生産（特に、アミラーゼ）と新しい分析方法を用いた活性測定法を学びたかった。

実現度

すでに、アミラーゼの生産と活性測定法については修得していたが、この研修で、グルコアミラーゼの精製とその性質について検討し、酵素の取扱い技術や情報等を得ることができたので満足している。

② 現在の仕事および実績

(1) 酵素、特に、アミラーゼの活性測定。(2) 高フラクトース含有タピオカシラップの開発に従事している。

西ドイツの Pharmaceutical and Lebensmittel Institute の "Chemical Technical Food Control" に1987年11月から1989年1月まで留学。

研修内容 (フレイバーテクノロジーの研究。食品に残存する殺虫剤の分析)

③ 現在の仕事に対する研修の効果

研修で得た知識ならびに技術は、高フラクトース含有タピオカシラップの開発に役だっている。

アミラーゼ分析が効率よくできるようになった。

④ 研修の改良点(意見)

研修内容については今のままで充分である。

6) Siriporn Stonsaovapak (1984)

① 研修前の期待と実現度

期待

酵素、特に、微生物酵素の研究をしたかった。

実現度

この酵素工学コースは、自分にとってたいへん満足のいくものであった。

② 現在の仕事および実績

食品中の微生物の検出。

帰国後、Food Microbial Control Course で NIH Kobe, KWEP Kobe, KQS Kobe へ4カ月の研修

研修内容 (腐敗防止の研究と発ガン物質の分析)

③ 現在の仕事に対する研修の効果

この酵素工学コースは、たいへん満足のいくものであが、現在、彼女の仕事はほとんどがルーチンワークのため研修効果を充分発揮することができない。しかし、次年度には Food Research Institute に配置がえられて、微生物酵素を取り扱うようになるので研修効果が期待される。

④ 研修の改良点（意見）

研修内容については今のままで充分である。

7) Vilai Santiopasri (1985)

① 研修前の期待と実現度

期待

微生物酵素の工業的利用について学びたかった。

実現度

この酵素工学コースは、満足のいくものであった。

② 現在の仕事および実績

カセサート大学 理学部 助手

酵素工学の講義を受け持っている。

③ 現在の仕事に対する研修の効果

大学での講義に役にたっている。

④ 研修の改良点（意見）

新しい技術や情報、たとえば、遺伝子操作などを含むコースにしてほしい。

8) Suntud Sirianuntapiboon (1986)

① 研修前の期待と実現度

期待

科学的研究に有益な生化学的実験技術の修得

日本の指導的研究者と知り合いになりたい

実現度

研修期間が短いこと、工業化への研修が含まれていないことより、満足度は非常に低かった

② 現在の仕事および実績

研究員

研究題目 メラニン色素の酵素的脱色、排水処理、動物飼料の開発

大阪大学へ留学（2週間） アルコール生産菌の遺伝学的研究

九州大学（3カ月／1年、5年間）アミノ糖の酸化酵素によるメラニン色素の脱色に関する研究

③ 現在の仕事に対する研修の効果

一応、研修で得られた知識は役だっているが、それを工業的応用についてはそれほど効果が認められなかった

④ 研修の改良点（意見）

日本語コースを1～2カ月にのばす

研修期間を7～8カ月に延長

遺伝子操作を内容に加えてほしい

9) Phen Thongnoi (1987)

① 研修前の期待と実現度

期待

食品分析における酵素の応用について学びたかった。

実現度

食品中の各種の糖についてさまざまな測定技術を研修してほしかったが、研修内容にはすべての糖測定技術は含まれていなかった。

② 現在の仕事および実績

食品成分の分析

英国 RHM research institute 1990年5月 1週間 食品の成分分析についての研修

③ 現在の仕事に対する研修の効果

現在の研究において使用する測定装置についての知識が得られたことが、役にたっている。

実験テクニックが高められ、短時間で良い結果を出せるようになった。

④ 研修の改良点（意見）

本人の希望に合う研修内容を短期間（1～2カ月間）で行ってほしい。

10) Sajee Suwansri (1988)

① 研修前の期待と実現度

期待

食品分析における酵素の応用について学びたかった。

実現度

酵素の精製技術とその諸性質を調べる方法については満足のいくものであったが、材料として用いたグルコアミラーゼは酵素として適当ではなく、これが食品分析に使われる酵素であったならば、より効果的であったと思う。

② 現在の仕事および実績

食品成分の分析

③ 現在の仕事に対する研修の効果

この研修によって、食品中の成分分析に酵素を用いるための知識が得られた。

④ 研修の改良点（意見）

6カ月の研修期間では、酵素工学に関する基礎的知識を修得するのが精いっぱいであるので、その期間を長くしてほしい。

研修に入る前に、日本語の研修をもっと充分にしてほしい。

11) Chantana Thumveerapong (1989)

① 研修前の期待と実現度

期待

有用酵素生産菌の検索やその酵素の精製に関する基礎的技術の修得

実現度

酵素の精製に関する基礎的技術は修得できたが、酵素生産菌の検索と培養ができなかったことが不満である。

② 現在の仕事および実績

科学者に情報を提供する仕事（事務職）

③ 現在の仕事に対する研修の効果

研修で得た知識などは、ある程度役にたっていると思う。

④ 研修の改良点（意見）

この研修コースの内容は、基礎的すぎる。有用酵素生産菌の検索を加えてほしい。

12) Duanthanorn Thawaranantha (1990)

① 研修前の期待と実現度

期待

酵素の工業的利用について学びたかった。

実現度

研修内容が基礎的すぎる。しかし、遺伝子操作の研修は満足いくものであった。

② 現在の仕事および実績

遺伝子操作技術を必要とする分野で研究に従事

③ 現在の仕事に対する研修の効果

現在、遺伝子操作で得た知識ならびに技術は役にたっている。

④ 研修の改良点（意見）

研修内容が基本的すぎる。短時間でできる研究的な内容に変更すればさらによいと思われる。

3. コース改善への提言

(1) レベル及び資格条件

今回の帰国研修員との面談では、本コースのレベルがやや基礎的すぎるのではないかとの指摘が多々あった。これは、本コースの参加資格条件を「修士、博士課程の修了者」としており、本コースが酵素工学の基礎分野を全般的に習得することを目的とする趣旨と同資格条件のミスマッチが原因とも言える。

特にタイの帰国研修員からは、本コースの資格に修士、ましてや博士課程の修了者は必要ないとの指摘が多かった。

但し本コースの「酵素工学に関する基礎分野の習得」という趣旨は、現在でもなお途上国からの研修員にとっては有効なニーズだと考えられる。事実、帰国研修員の中でも、本コースに参加し基礎を習得した後、日本学術振興会の論文博士制度を利用して名古屋大学から博士の学位を取得したり (Ms. Jiraporn, 1978)、オーストラリア・ニューサウスウェルズ大学に留学の後、食品工学の Ph.D を取得している研修員 (Ms. Molsiri, 1982) も見られる。彼女らは、本コースでの勉強は、基礎的な機材でも自国では触れることのできなかったものを自由に操作できたことや、基礎理論の徹底習得という意味で、これら自己のキャリア向上の土台として極めて有効であったとコメントしている。その他の帰国研修員も、レベルの問題に関しては、コースの趣旨さえ明確にしてくればなんら問題はないとの意見であった。

今後は、本コースがあくまでも「酵素工学の基礎分野を全般的に習得する」ことを目的とする趣旨を G I 等に明確にし、研修員には、来日前にコースの趣旨を周知してもらうことに努めるとともに、同趣旨にあった資格条件を再検討する必要もあるであろう。

(2) コース形態

本調査団においては、前述のとおり中国 5 名、タイ 12 名の研修員と面談をもつことができた。

特に、タイの帰国研修員 12 名との面談を通じて、12 年間におけるコース形態の改変の過程を確認できたことが貴重であった。

本コースは、昭和 53 年度 (1978 年度) の第 1 回目から昭和 57 年度 (1982 年度) の第 4 回目までは、各研修員のそれぞれの専門領域を深めるため、全期間 6 ヶ月を研修員の選んだ選択課題に応じ、各研修室に分かれての専門的な研修を行っていた。いわば、集団研修ではありながらも、実状は個別研修に近い研修形態をとっていたことになる。しかしながら、同形態をとった場合、各研究室の指導研究員の負担が大きいこと、および研修員同志の交流が極めて希薄になる等、諸々の事情により次年度昭和 58 年度 (1983 年度) の第 5 回から昭和 61 年度 (1986 年度) の第 8 回までは、個別形態の学習をすべて廃止し、全期間全研修員が共通の講義実験等を受ける純粋な集団コースの形態をとった。

しかしながら、バックグラウンド、レベル、ニーズ等が様々である研修員が全員 6 ヶ月間に

わたり共通の講義、実験等を受けることは、特に研究者の多い本コースの研修員にとっては無理なところもあり、コース修了時の評価会では毎年、個々のニーズを満足させるような個別的な研修もカリキュラムの中に含めるようとの要望が出ていた。

これら希望を考慮し、昭和62年度(1987年度)の第9回より平成2年度(1990年度)の第12回までは、全体期間6ヶ月のうちコース最終段階の1~2週間(第9、10回は1週間、第11、12回は2週間)を、個別の選択課題研修(3テーマのうちから1テーマを選ぶ)にあて、わずかではあるが、少しでも研修員の個別のニーズを満足させることができるカリキュラム構成になった。

以上をまとめてみると第1回目から第4回目までの4回は個別タイプのカリキュラム、第5回目から第8回目までの3回は純粋な集団タイプのカリキュラム、第9回目から最近の第12回目までの3回は集団と個別のミックスタイプ、と、コースのカリキュラム形態が変遷していることがわかる。いずれも受入側の事情や研修員の希望等諸事情を勘案した結果の変遷であり、最終的に現在の集団と個別のミックスタイプにおちついている。

これら本コースの過去の歴史、諸事情を考慮すると、現在の研修タイプは試行錯誤の上確立されたものであり、集団コースという制約を考えると、かなり成熟された、完成されたコースカリキュラムといえる。ただし、今回の帰国研修員との面談でも、個別的研修を受けた研修員からは良い評価が得られたが、純粋な集団タイプの研修を受けた者からは不評であったことや、今後の研修員のニーズがますます多様化していくことを考えると、個別的研修期間を長くすることや、個別選択課題を増やすことが懸案となるであろう。現在、平成3年度(1991年度)のカリキュラムを検討中であるが、個別的研修期間を1ヶ月、個別選択課題を6テーマくらいに増やすことも考えている。

IV 公開技術セミナーの開催

今回のフォローアップ調査団は、当該分野の近年の技術進歩が目覚ましいため、通常のフォローアップ調査に併せ、我が国における最新の技術情報を提供するため、中国では2回（北京、上海）、タイでは1回の公開技術セミナーを実施した。

1. 公開技術セミナーの概要

(1) テーマおよび講演者

① 大江達彦

「細菌によるスルホ化ナフタリンの代謝」

従来より、ハロゲン化合物、ニトロ化合物、スルホ化合物、高分子化合物あるいは分岐鎖構造をもつ化合物は一般に微生物による分解を受け難い。ところがこれら化合物は産業上重要なものが多く、多くの場合分解されずに、廃水に含まれて自然界に放出され、環境保全のうえからも大きな問題となっている。ところが、これら難分解化合物は、ある特定の微生物による前処理によって、無毒化したり、分解したりすることができる。そこで、これら化合物の構造に関し、微生物分解の可能性、あるいは分解機構について理解することが、環境問題への対応からも、また生態系を乱さないうえからも重要である。こうしたことに鑑み、近年の環境問題に対する関心が高まっている時期を考慮し、このテーマをとりあげた。

② 室 哲雄

「プロテアーゼによるペプチド合成」

プロテアーゼは本来、蛋白質やペプチドに作用して、ペプチド結合の加水分解反応を触媒する酵素であり、従来こうしたプロセスを利用して、プロテアーゼが食品あるいは医薬品の分野で広く活用されてきた。具体的には味噌、醤油の醸造、チーズの製造、蛋白質混濁防止に、さらに医薬品の代謝性酵素製剤として、広く用いられている。

しかし、その逆反応である縮合反応や転移反応を利用すればアミノ酸やペプチドを起点として、高重合度のペプチドの合成が可能となり、食品分野での風味の改善、栄養強化、物性の改良など、また、医薬品の分野では、生理活性ペプチド合成などに利用され、プロテアーゼの利用範囲がいっそう拡大される。

これらは今後の食品や医薬品のいっそうの高度化や多元化に資するものである。

③ Mrs. JIRAPORN (1978年度帰国研修員)

「タイの酵素工学の現状」(バンコクセミナーのみ)

(2) 日時、場所および参加者

① 中 国

・北京(平成2年12月5日 14:00~17:00) 於:国際協力事業団中国事務所会議室

参加者数 41名

・上海（平成2年12月10日 14:00～17:00） 於：錦江飯店会議室

参加者数 17名

② タイ国

・平成2年12月13日 14:00～17:00 於：インパラホテル会議室

参加者数 21名

2. 公開技術セミナーに対する所感

両国における公開セミナーは熱心な参加者が真剣に聴き入り、熱のこもった質問を発していた。両国とも醸造業分野では長い伝統をもち、また、研究者および技術者の層も厚く、研究対象も多様化しており、今後の両国における研究成果と技術進歩が期待される。

添付資料

1. 公開技術セミナー配布資料
（日文、英文、中国文）
2. 帰国研修員リスト
3. 国別受入者数

有機化合物が微生物によって代謝分解を受けることはよく知られている。しかし、ハロゲン化合物、ニトロ化合物、スルホ化合物、高分子化合物あるいは分岐鎖構造をもつ化合物は微生物による分解を受け難い。伝統的な廃水処理システムでそのような構造を持つ天然および合成の有機化合物を含む廃水を処理する場合、それらの化合物はほとんど処理されることなく環境へ放出される。また、これらの化合物が高濃度で含まれる場合、廃水の微生物処理が阻害されることもある。難分解性化合物には産業上重要なものも多く、各種の化学工業において大量に生産されている。その結果、それらの一部はいろいろな経路をたどり環境中へ放出され、環境汚染を引き起こす。図1に化合物が環境中へ放出される経路を示したが、難分解性化合物の微生物処理はそれらの化合物が他の物質と混合する前の段階で行なうことが原則である。すなわち、難分解性化合物の微生物処理には、その化合物を変換あるいは資化できる特定の微生物を用いるので、他の微生物や他の化合物によって生態系が乱されないようにしなければならない。

バイオテクノロジーは微生物的な手段を用い、難分解性化合物の無毒化や分解あるいはリサイクルを行い、それらの問題の軽減に役立つ可能性を持っている。しかし、そのような微生物の応用途の開発の前に、化合物の構造に関して微生物分解の可能性、あるいは分解機構について、理解しておくことが重要である。現在、多数の研究により、今まで分解が極めて困難であろうと考えられていた化合物についても、分解、資化する新しい微生物が発見されている。しかしこれらの化合物の代謝機構が解明されている例は少なく、この分野の研究の進展が望まれている。

当所では、数年前より、有機化合物の微生物変換の研究に着手した。研究対

象化合物として、微生物変換の機構がほとんど明らかにされていないアゾ染料合成の原料であるナフタリンスルホン酸を選んだ。土壌より集積培養法によって1-ナフタリンスルホン酸、2-ナフタリンスルホン酸、1,6-ナフタリンスルホン酸等を資化する数株の細菌を単離し、それらの微生物による化合物変換機構を調べた。

[結果]

2-ナフチルアミン-1-スルホン酸(トピアス酸)を唯一の栄養源として生育できる *Pseudomonas* に属する微生物を土壌より分離した。この細菌はトピアス酸以外に1-ナフタリンスルホン酸もよく分解した。栄養培地で生育した細菌をトピアス酸培地で2次培養すると中間代謝物としてサリチル酸を培地へ一時的に蓄積した。サリチル酸およびゲンチジン酸分解酵素はそれぞれ、サリチル酸およびゲンチジン酸によって誘導された。しかし、サリチル酸によるカテコール酸化活性の誘導は認められなかった。一方、スルホ化ナフタリンをサリチル酸へ変換する酵素系は構成的であった。トピアス酸の分解に伴って、アンモニア、硫酸および微量の亜硫酸が培地に蓄積された。2-ナフトール-8-スルホン酸は2,4-ジヒドロ安息香酸に、1-ナフトール-5-スルホン酸は2,6-ジヒドロ安息香酸に変換された。2-ナフタリンスルホン酸培地で細菌を培養するとシス-1,2-ジヒドロオキシ-1,2-ジヒドロ-3-ナフタレンスルホン酸および硫酸が培地へ蓄積した。

高濃度のゲンチジン酸存在下で菌を培養し、 $[^{14}\text{C}]$ サリチル酸を培地に加えると、 $[^{14}\text{C}]$ ゲンチジン酸および $[^{14}\text{C}]$ ピルビン酸が減少したサリチル酸の化学等量に見合った量蓄積された。また、ゲンチジン酸およびカテコール存在下で $[^{14}\text{C}]$ 1-ナフタレンスルホン酸は $[^{14}\text{C}]$ ゲンチジン酸に変換されたが、 $[^{14}\text{C}]$ カテコールの培地への蓄積は認められなかった。以上の結果

より明らかになったこの菌によるトピアス酸の分解機構を図7に示した。

文献

Degradation of 2-Naphthylamine-1-sulfonic Acid by *Pseudomonas* Strain TA-1

Agric. Biol. Chem., 50, 1419-1426 (1986)

Microbiol Degradation of 1,6- and 2,6-Naphthalenedisulfonic Acid by *Pseudomonas* sp. DS-1

Agric. Biol. Chem., 52, 2409-2414 (1988)

Metabolism of Naphthalenesulfonic Acid by *Pseudomonas* sp. TA-2

Agric. Biol. Chem., 54, 669-675 (1990)

Salicylic Acid Metabolism through a Gentisate Pathway by *Pseudomonas* sp. TA-2

Agric. Biol. Chem., in press

Metabolism of Sulfonated Naphthalene by Bacteria

Tatsuhiko Ohe

It is known well that organic compounds were mineralized by microorganisms. However, halogenated compounds, nitro compounds, sulfonated compounds, polymer and compounds with a branched carbon chain structure resist mineralization. When the wastes containing natural and synthetic organic compounds with such a structure are treated in the traditional system of biological waste treatment, these compounds are released into the environment, having scarcely been treated. The biological waste treatment is hindered occasionally when these compounds are contained in high concentrations. Among the poorly degradable substances, there are those which are important industrially and produced massively in various chemical industries. As a result, a part of the substances are released into the environment through various routes, bringing about environmental pollution. Fig. 1 shows the routes through which the compounds are released into the environment. It is a principle that the biological waste treatment of poorly degradable substances is carried out at the state prior to the process when these compounds mix with other substances. In other words, the biological waste treatment of poorly degradable substances must be made in a way that the ecosystem is not disturbed by microorganisms in general and other compounds as the specific microorganisms which can convert or assimilate such compounds are used.

Biotechnology has the possibility of being useful for reducing these problems by detoxicating, degrading or recycling the poorly degradable substances by the use of biological procedure. However, it is essential to understand the possibility of microbial degradation or the mechanism of microbial degradation regarding the structures of the compounds as prerequisite to develop such a biological application. At present, new microorganisms which can degrade and assimilate the poorly degradable compounds have been discovered owing to many researches made so far. However, there are only a few cases in which the metabolic mechanism of those compounds has been elucidated, and a hope is entertained for the research in this field to attain progress.

Our institute had started the study regarding microbial conversion of organic compounds several years ago. As the subject compound for the research, selected was naphthalene sulfonic acid, the raw material for the synthesis of azo dye whose mechanism of microbial conversion has scarcely been elucidated. Several strains of the bacteria which utilize 1-naphthalene sulfonic acid, 2-naphthalene sulfonic acid, 1,6-naphthalene disulfonic acid, etc. were isolated from soil by enrichment culture to assess the mechanism of compounds being subjected to conversion by the microorganisms.

[Results]

A *Pseudomonas* strain capable of using 2-naphthylamine-1-sulfonic acid (Tobias acid) as a sole source of carbon and nitrogen was isolated from soil. This bacterium degraded not only Tobias acid but also 1-naphthalene sulfonic acid well. As a result of putting the bacterium grown in a nutrient medium to the second cultivation in a Tobias medium, it accumulated salicylate as an intermediate in the medium transitorily. Salicylate and gentisate oxidizing enzyme were induced by salicylate and gentisate, respectively. However, no induction of catechol oxidizing activity by salicylate was observed. On the other hand, the enzymes which convert sulfonated naphthalene into salicylate were constitutive. Along with the degradation of Tobias acid, ammonia, sulfuric acid and a trace of sulfite were accumulated in the medium. 2-naphthol-8-sulfonate and 1-naphthol-5-sulfonate were converted into 2,4-dihydroxybenzoate and 2,6-dihydroxybenzoate, respectively. As a result of culturing bacteria in a 2-naphthalene sulfonic acid medium, ces-1,2-dihydroxy-1,2-dihydro-3-naphthalene sulfonic acid and sulfuric acid accumulated in the medium.

As a result of culturing bacteria in the presence of gentisate in a high concentration and adding [^{14}C] salicylate to the medium, [^{14}C] gentisate and [^{14}C] pyruvate were accumulated stoichiometrically with salicylate decreased. [^{14}C] 1-naphthalene sulfonic acid was converted into [^{14}C] gentisate in the presence of gentisate and catechol, but no accumulation of [^{14}C] catechol was observed in the medium. Fig. 7 illustrates the degradation pathway of Tobias acid by this bacterium which was elucidated from the above results.

Literature

Degradation of 2-Naphthylamine-1-sulfonic Acid by Pseudomonas Strain TA-1

Agric. Biol. Chem., 50, 1419-1426 (1986)

Microbial Degradation of 1,6- and 2,6-Naphthalenedisulfonic Acid by Pseudomonas sp. DS-1

Agric. Biol. Chem., 52, 2409-2414 (1988)

Metabolism of Naphthalenesulfonic Acid by Pseudomonas sp. TA-2

Agric. Biol. Chem., 54, 669-675 (1990)

Salicylic Acid Metabolism through a Gentisate Pathway by Pseudomonas sp. TA-2

Agric. Biol. Chem., in press

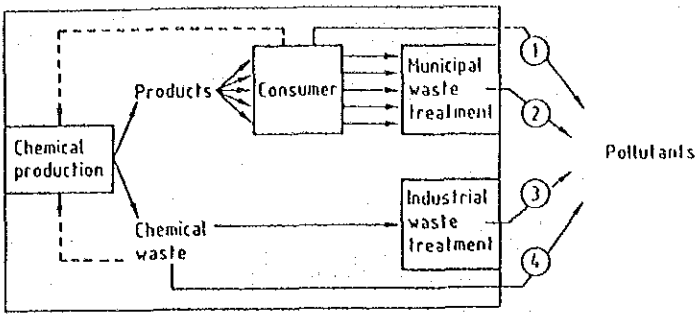


Figure 1. Release of organic chemicals into the environment (from LEISINGER, 1983). 1 Chemicals whose use leads to their entry into the environment, e.g., aerosol propellants, pesticides, fertilizers. 2 Chemicals entering the environment in the effluents of municipal sewage treatment systems, e.g., hard detergents, solvents. 3 Chemicals resistant to biological degradation in industrial waste treatment systems, e.g., chlorobenzenes, aminonaphthol sulfonic acids. 4 Direct discharge, losses, spills and accidents leading to the entry of chemicals from production sites into the environment.

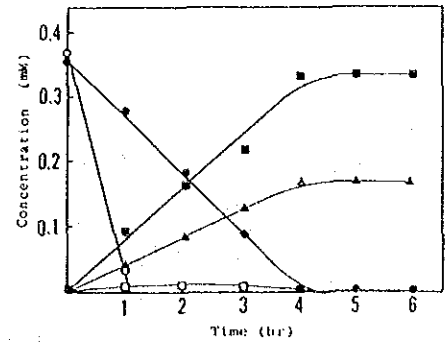


Fig. 2 Course of Tobias Acid Degradation by Washed Cells of Strain TA-2 Grown on Tobias Acid.

Strain TA-2 grown on tobas acid was in the incubation medium containing tobas acid at 30 C with shaking. Tobias acid (—●—), sulfate (—■—), sulfite (—□—), and ammonia (—▲—) were measured every hr. The cells were incubated with sulfite (—○—).

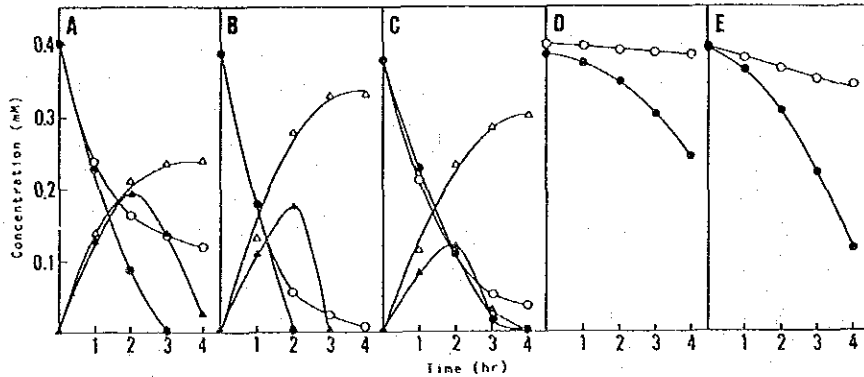


Fig. 3. Course of Tobias Acid, 1NS, 2NS, Salicylate, and Gentisate Degradation by Washed Cells of Strain TA-2 Grown on Nutrient Medium.

The cells were incubated with tobas acid (A), 1NS (B), 2NS (C), salicylate (D), and gentisate (E) (—●—) alone, or a mixture of substrate (—○—) and chloroamphenicol (CM) (100 ppm). Substrate and accumulated salicylate (—▲—, CM free; —△—, incubated with CM) were measured every hr.

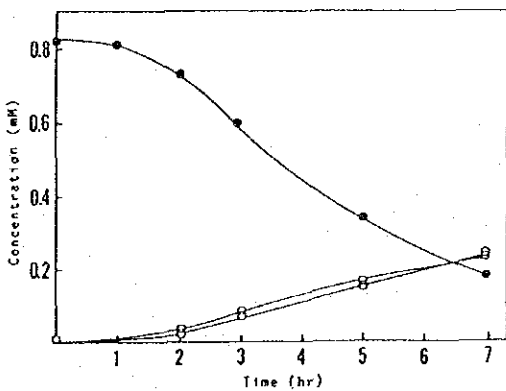


Fig. 4. Course of 2-Naphthalenesulfonate Degradation by Washed Cells Grown on Tobias Acid.

2NS (—●—), *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydro-3-naphthalenesulfonate (—□—) and sulfate (—○—) were measured every hr.

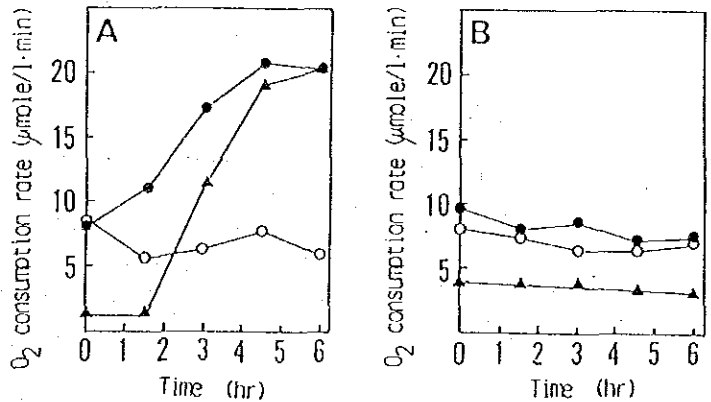


FIG. 5. Changes in Oxidizing Activities to Salicylate, Gentisate and Catechol by the Cells incubated with Tobias Acid.

The cells were incubated with tobas acid (A) and with no substrate (B). Salicylate (▲), gentisate (●) and catechol (○) were added to the cuvette equipped a oxygen electrode to make 140ppm.

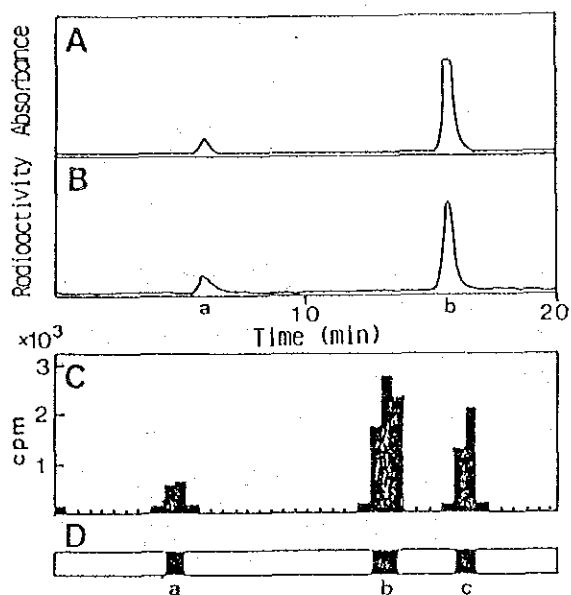


Fig. 6 HPLC and TLC of the Mixture of Cold Pyruvate and the Incubated Medium of $[7-^{14}\text{C}]$ Salicylate for Two Hours in the Presence of Excessive Cold Gentsiate. Pyruvate(a) and gentisate(b) were detected by radio HPLC equipped a solid scintillation counter (B) and a spectrophotometer (A). On the TLC, pyruvate(a), gentisate(b) and salicylate(c) were detected as dark spot under the ultra violet light (D). The radioactivities of the powder scraped from the TLC plates were measured by the liquid scintillation counter (C).

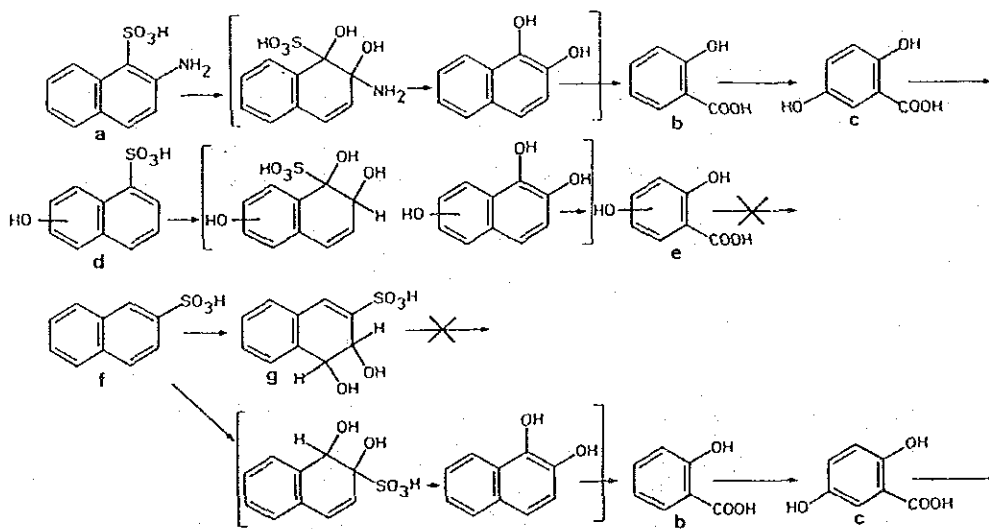


Fig. 7. Proposed Degradation Pathway of Naphthalenesulfonates by Strain TA-2.

Letters are compound designations as follows: a, tobias acid; b, salicylate; c, gentisate; d, 2-naphthol-8-sulfonate or 1-naphthol-5-sulfonate; e, 2,4- or 2,6-dihydroxybenzoic Acid; f, 2-naphthalenesulfonate; g, *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydro-3-naphthalenesulfonate.

有机化合物受微生物代谢分解是众所周知的，但卤化合物、硝基化合物、磺化合物、高分子化合物以及具有支链结构的化合物难以被微生物分解。以一般的废水处理系统处理含有具有这种结构的天然或人造有机化合物的废水时，这些化合物几乎完全不被分解，直接流放于环境内。如果这些化合物浓度较高时，微生物对废水的处理能力可能受到阻碍。在产业上重要的化合物之中有不少部分均属难分解性化合物，各种化工领域大量生产这种化合物。其中一部分经过各种途径流放于环境内，造成环境污染。图1是化合物流放于环境中的途径，以微生物处理难分解性化合物原则上在该化合物与其它物质混合之前进行。由于对难分解性化合物进行微生物处理时使用能够将化合物变换或资化的特定微生物，因此应避免其它微生物或其它化合物扰乱生态系。

生物工艺学具有以微生物性手段对难分解性化合物进行无毒化、分解或者再循环的可能性，对减轻这些问题作出贡献。但开发这些微生物应用方法前，我们必须就化合物的结构了解微生物分解的可能性以及分解机理。现在，通过多数的研究，对从前认为极为难以分解的化合物也发现了分解、资化的新微生物，但目前这些化合物大部分都未解明代谢机理，必须使这方面的研究更进一步进展。

自数年前，本所从事研究微生物对有机化合物的变换。作为研究对象的化合物，我们选出了偶氮染料的原料——萘磺酸。萘磺酸的微

生物变换机理几乎完全未解明。通过 enrichment 培养法从土壤中分离出对 1-萘磺酸、2-萘磺酸、1.6-萘二磺酸等进行资化的数株细菌，研究了这些微生物变换化合物的机理。

(结 果)

从土壤中分离出了属于 *Pseudomonas*，以 2-氨基萘-1-磺酸（托拜厄斯酸）为唯一的营养源而生长的微生物。该细菌除托拜厄斯酸外，还可分解 1-萘磺酸。把在营养培地生长的细菌再在托拜厄斯酸培地进行二次培养，就作为中间代谢物，在培地内暂时地积累了水杨酸。水杨酸及龙胆酸氧化酶分别由水杨酸及龙胆酸诱导，但水杨酸对儿茶酚氧化活性没有诱导作用。另一方面把磺化萘变换为水杨酸的酶系是 constitutive 的。随着托拜厄斯酸的分解，在培地中积累了氨、硫酸以及微量的亚硫酸。2-萘酚-8-磺酸被变换为 2.4-二氢安息香酸，1-萘酚-5-磺酸被变换为 2.6-二氢安息香酸。在 2-萘磺酸培地培养细菌，就在培地内积累了顺式-1,2-二羟-1,2-二氢-3-萘磺酸及硫酸。

在有高浓度龙胆酸存在的条件下培养细菌，并在培地上加以 (^{14}C) 水杨酸，就积累了 (^{14}C) 龙胆酸及 (^{14}C) 丙酮酸，其量在化学计量学上相等于水杨酸减少量。在有龙胆酸及儿茶酚存在的条件下，(^{14}C) 1-萘磺酸被变换为 (^{14}C) 龙胆酸，但 (^{14}C) 儿茶酚没有积累于培地。根据上述结果而解明的该细菌分解托拜厄斯酸的机理示于图 7。

资料：

Degradation of 2-Naphthylamine-1-sulfonic Acid by pseudomonas

Strain TA-1

Agric. Biol. Chem., 50, 1419-1426 (1986)

Microbiol Degradation of 1,6- and 2,6-Naphthalenedisulfonic Acid
by *Pseudomonas* sp. DS-1

Agric. Biol. Chem., 52, 2409-2414 (1988)

Metabolism of Naphthalenesulfonic Acid by *Pseudomonas* sp. TA-2

Agric. Biol. Chem., 54, 669-675 (1990)

Salicylic Acid Metabolism through a Gentisate Pathway by *Pseudomonas* sp. TA-2

Agric. Biol. Chem., in press

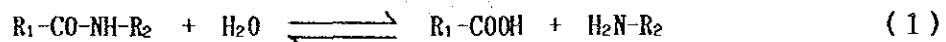
プロテアーゼによるペプチド合成

室 哲雄

プロテアーゼは、本来、タンパク質やペプチドに作用して、ペプチド結合の加水分解反応を触媒する酵素である。これまでに、プロテアーゼが食品あるいは医薬品の分野で用いられてきたのは、ほとんどがその加水分解作用を利用したものである。たとえば、味噌、醤油の醸造における微生物プロテアーゼの利用、チーズの製造に使われるレンニンや微生物レンニン、ビール中におけるタンパク質混濁防止のための chillproofing enzyme としてのパパインの利用、医薬品とくに代謝性酵素製剤としてのプロテアーゼの利用などがある。しかし、その逆反応である縮合反応や転移反応を利用すれば、アミノ酸やペプチドを出発物質として、より高重合度の有用ペプチドの合成が可能となり、食品の分野では、風味の改善、栄養強化、物性の改良など、また、医薬品の方面では、生理活性ペプチドの合成などに、これらの作用が有効な手段になると期待される。

1. プロテアーゼの加水分解作用と縮合作用

特定のペプチド結合に対するプロテアーゼの作用は、(1)式に示すように、加水分解反応と縮合反応という正逆両反応で表される。



この加水分解反応と縮合反応からみた平衡定数を、それぞれ K_{hyd} と K_{cond} とおくと、(2)式が得られる。

$$K_{hyd} = \frac{1}{K_{cond}} = \frac{[R_1-COOH][R_2-NH_2]}{[R_1-CO-NH-R_2][H_2O]} \quad (2)$$

したがって、

$$\begin{aligned} [R_1-CO-NH-R_2] &= \frac{[R_1-COOH][R_2-NH_2]}{[H_2O]} \cdot K_{cond} \\ &= \frac{[R_1-COOH][R_2-NH_2]}{[H_2O] \cdot K_{hyd}} \end{aligned} \quad (3)$$

(3)式から明らかのように、 R_1-COOH と R_2-NH_2 から出発して、縮合反応によって $R_1-CO-NH-R_2$ を収率よく得るためには、これらの基質の濃度を高めるとともに、反応系に有機溶媒などを添加して水の濃度を下げたりすることが有効である。

しかし、有機溶媒を含まない水溶液中で、酵素により効率のよい縮合反応を行うことは、種々の点、たとえば、食品あるいは医薬品の分野における安全性という点からみて意義の

あることと考えられる。

2 サブサイトの特性

縮合反応を効率よく行うためには酵素の選択も重要なポイントであり、特定のペプチドを合成しようとする場合、その合成反応を触媒する酵素の活性部位におけるサブサイトの特性が、その合成反応に大きな影響を与えることが考えられる。たとえば、図1に示すように、ジペプチド(X-Y)から、その二量体であるテトラペプチド(X-Y-X-Y)を効率よく合成するには、酵素のサブサイト S_2 と S_1 、および S_1' と S_2' のそれぞれ、あるいは両方が、X-Yに対して適度の親和力を有することが必要であると考えられる。このような特定のペプチドの合成に適したサブサイトを有する酵素が得られれば、水溶液中においても効率の良い縮合反応が期待できる。

3. 縮合作用の強いプロテアーゼ生産菌の検索

水溶液中で顕著な縮合作用を示すプロテアーゼ生産菌を広く検索した。検索の目安として、便宜上、アラステイン反応による濁度形成力(TA)とミルクカゼインを基質として用いたタンパク分解活性(PA)とを測定し、両者の比(TA/PA)を求めた。この比の大きなプロテアーゼを生産する菌株として、*Streptomyces cellulosa*を得た。本菌の生産するプロテアーゼ SCC は、他の各種起源の酵素と比較して、ミルクカゼイン分解活性が弱く、かつ、大豆タンパク-ベアシン分解物を基質に用いたとき、反応初期に急激な濁度の増加が観察され、対照に用いた各種起源のプロテアーゼとは全く異なる挙動を示した(図2)。このことからペプチド合成に関して、本菌の生産するプロテアーゼの特異性が他の起源の酵素よりも高いものと推察された。

4. ジペプチドに対するプロテアーゼ SCC の作用

プロテアーゼ SCC のペプチド合成における反応特異性を明らかにするために、基質として高濃度の各種ジペプチドを用いて反応を行った。その結果、疎水性のアミノ酸どうしからなるジペプチドである Phe-Val, Val-Phe, および Leu-Met などを基質に用いた場合、本酵素の作用によって反応液は著しく濁り沈澱物が析出した。Phe-Val から生成した沈澱物について、アミノ酸組成、N末端アミノ酸とC末端アミノ酸の分析など、各種の分析を行った結果、その構造は (Phe-Val)₂ であり、また、Val-Phe, および Leu-Met からの生成物は、それぞれ (Val-Phe)₂, (Val-Phe)₃ と (Leu-Met)₂, (Leu-Met)₃ であることがわかった。一方、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸とからなるジペプチド、たとえば、Leu-Gly を基質に用いた場合には、(Leu-Gly)₂ (P_{LG1}) と (Leu-Gly)₃ (P_{LG2}) が合成されるが、この場合、上記のような濁りや沈澱は全く認められなかった。

次に、本酵素による P_{LG1} と P_{LG2} との合成について、他の起源のプロテアーゼのそれと比較した(表1)。(P_{LG1} + P_{LG2})/PAの値についてみると、プロテアーゼ SCC が、大きな値を示し、ミルクカゼイン分解活性1単位あたりのペプチド合成力の強い酵素であることがわかった。

5. プロテアーゼ SCC の縮合反応に関する速度論的解析

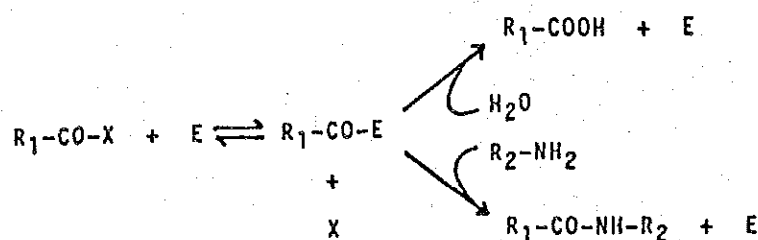
本酵素が水溶液中で数種のジペプチドから、縮合反応によってその二量体や三量体を合成する。このような作用を有する本酵素の活性部位におけるサブサイトの特性を明らかにするため、特に縮合反応に主眼をおいて速度論的解析を行った。

その結果、図3に示すように、本酵素の活性部位のサブサイト S_2 と S_1 に Leu-Gly が結合する場合の解離定数は 0.65 M 、サブサイト S_1' と S_2' に Leu-Gly が結合する場合の解離定数は、 0.016 M であることが明らかとなった。

これらの速度論的解析の結果より、本酵素の活性部位のサブサイト S_1' と S_2' は、サブサイト S_2 と S_1 に比べて Leu-Gly に対する親和性が非常に大きいことがわかり、このことが、 $(\text{Leu-Gly})_2$ や $(\text{Leu-Gly})_3$ を合成する縮合反応が顕著に起こることの主要な原因であると考えられた。

6. プロテアーゼの加水分解作用と転移作用

次式に示すように、基質 $R_1\text{-CO-X}$ を用いた時のプロテアーゼの加水分解反応と転移反応について考えてみよう。



加水分解反応は、中間体として生成したアシル化酵素 ($R_1\text{-CO-E}$) が、水分子の攻撃を受けて脱アシル化され完了する。もし、その反応系に $R_2\text{-NH}_2$ が存在し、それが水分子よりも強力な求核攻撃をするなら、 $R_1\text{-CO-NH-R}_2$ が生成する転移反応が起こる。ここで、転移速度は脱離基 X との結合様式に強く依存し、エステル結合の場合はアミドあるいはペプチド結合の場合よりもはるかに速い。

7. 転移作用の強いプロテアーゼの検索

水溶液中で顕著な転移作用を示すプロテアーゼを検索した。検索の目安として、フェニルアラニンのヒドロキサム酸生成力 (HA) とミルクカゼインを基質として用いたタンパク分解活性 (PA) とを測定し、両者の比 (HA/PA) を求めた。その結果、この比の大きなプロテアーゼを生産する菌株として、Streptomyces griseus var. alcalophilus を得た。本菌の生産するプロテアーゼを精製し、プロテアーゼ I と命名した。

8. 転移反応におけるプロテアーゼ I の供与体特異性

プロテアーゼ I は、中性付近で最大の転移活性を示すセリンプロテアーゼであり、アミノ酸エステルとヒドロキシルアミンからアミノ酸のヒドロキサム酸を合成するという特徴を持っている。

そこで、各種アミノ酸エステルとヒドロキシルアミンとを用いて、転移反応における本

酵素の供与体特異性を検討した。その結果、プロテアーゼ I は、酸性、中性、および塩基性のほとんどのアミノ酸のヒドロキサム酸を合成するという広い供与体特異性を示した（表 2）。今後、種々のペプチドを合成する場合、本酵素がこのような特性を有することは非常に有望であると考えられた。

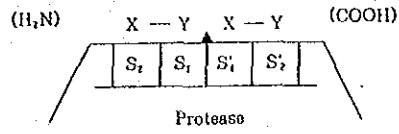


図1 プロテアーゼの活性部位とジペプチド (X-Y) の結合様式

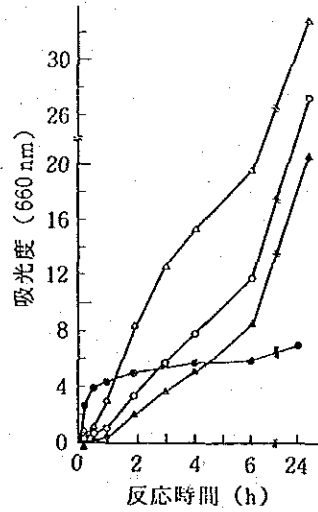


図2 大豆タンパクペプシン分解物に対する各種起源のプロテアーゼの作用

- : *Streptomyces cellulosae* の生産するプロテアーゼ (鞣安塩析酵素), ○: α-キモトリプシン,
- △: ビオプラゼ (*Bacillus subtilis* var. *Biotecus*),
- ▲: プロザイム (*Streptomyces* No.1033)

表1. 各種起源のプロテアーゼによる PLG₁ と PLG₂ の合成

プロテアーゼ	タンパク質 分解活性 ^{a)} (PA) (U/ml)	PLG ₁ +PLG ₂ ^{b)} (μ M/min)	PLG ₁ +PLG ₂
			PA
プロテアーゼ SCC (<i>S. cellulosa</i>)	25	250	10
α -キモトリプシン	1,000	10	1.0×10^{-2}
パパイン	1,000	4.2	4.2×10^{-3}
サーモリシン	1,000	13	1.3×10^{-2}
プロザイム (<i>Streptomyces</i> No.1033)	1,000	49	4.9×10^{-2}
ビオプララーゼ (<i>B. subtilis</i> var. <i>Bioteucus</i>)	5,000	0	0
スブチリシン BPN'	10,000	0	0
アルカリプロテアーゼ (<i>S. griseus</i>)	10,000	0	0
プロテアーゼ A (<i>A. oryzae</i>)	10,000	0	0
中性プロテアーゼ (<i>S. griseus</i>)	10,000	0	0

a) ミルクカゼインを基質に用いたときのタンパク質分解活性を示す。

b) 0.2M Leu-Gly を基質に用いたときの PLG₁ と PLG₂ との合成初速度の和を示す。

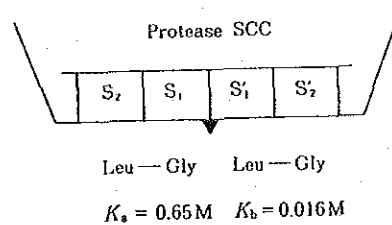


図3 プロテアーゼ SCC の活性部位 (サブサイト) に対する Leu-Gly の結合様式とその解離定数

表2. *Streptomyces griseus* var. *alcalophilus* の生産する
 プロテアーゼ I の転移作用による各種アミノ酸のヒドロキサム酸
 の合成

Donor	Concentration (M)	Relative activity	Donor	Concentration (M)	Relative activity
Phe-OEt	0.1	100	Ac-Phe-OEt*	0.04	112
Phe-OMe	0.1	170	Ac-Tyr-OEt*	0.1	267
Tyr-OEt	0.1	297	Ac-Val-OMe	0.1	23
Leu-OEt	0.1	127	Ac-Leu-OMe*	0.1	299
Val-OMe	0.1	10	Ac-Arg-OMe	0.1	37
Arg-OMe	0.1	6	Ac-Lys-OMe	0.1	90
Arg(NO ₂)-OBzl*	0.1	21	Ac-Asp-OMe	0.1	43
Lys-OEt	0.1	13	Ac-Glu- α -OMe*	0.05	165
Asp-di-OBzl*	0.04	76	Ac-Pro-OMe	0.1	0
Glu- α -OBzl*	0.025	66	Bz-Arg-OEt	0.1	13
Glu-di-OBzl*	0.04	37	Bz-Lys-OMe*	0.1	27
Glu-di-OEt	0.1	23	Bz-Ala-OMe*	0.1	29
Glu-Y-OMe	0.1	0	Bz-Gly-OEt*	0.1	14
Ser-OMe	0.1	20	Ac-Gly-Lys-OMe	0.1	43
Gly-OEt	0.1	7	Cbz-Val-Phe-OMe*	0.02	22
Asp-Phe-OMe*	0.033	11	Cbz-Phe-Leu-OMe*	0.02	7
			Cbz-Ser-Leu-OMe*	0.03	88

Ac : Acetyl; Bz : Benzoyl; Cbz : Carbobenzoxy; -OEt : Ethoxy;
 -OMe : Methoxy; -OBzl : Benzyloxy.

* 25% Dimethyl sulfoxide 含有

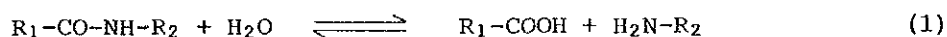
Synthesis of Peptide by Protease

Tetsuo Muro

Protease is essentially an enzyme which catalyzes the hydrolysis reaction of peptide bonds of protein and peptide. The uses of protease made in the fields of foods and pharmaceutical so far are mostly utilizations of the hydrolysis reaction. For example, there are utilizations of microbial protease for brewings of bean paste and soy, rennin and microbial rennin used for the production of cheese, papain as chill proofing enzyme having the beer-stabilizing activity and protease as pharmaceutical, particularly as enzyme regulating metabolism. However, a hope is entertained that, if the condensation reaction and transfer reaction are utilized, synthesis of high-quality peptides having much larger molecular weights becomes possible with amino acid and peptide as starting substances, these reactions becoming the effective measures for improvement of tastes, strengthening of nutrition and modification of material-quality in the food manufacturing and synthesis of biologically active peptide in the medical field.

1. Hydrolysis reaction and condensation reaction of protease

The action of protease on specific peptide bond is expressed by positive and reverse reactions which are hydrolysis reaction and condensation reaction, respectively, as shown in the equation (1)



If the equilibrium constants seen from these hydrolysis reaction and condensation reaction are replaced by K_{hyd} and K_{cond} , respectively, the equation (2) is obtained.

$$K_{\text{hyd}} = \frac{1}{K_{\text{cond}}} = \frac{[R_1\text{-COOH}][R_2\text{-NH}_2]}{[R_1\text{-CO-NH-R}_2][\text{H}_2\text{O}]} \quad (2)$$

Therefore,

$$\begin{aligned} [R_1-CO-NH-R_2] &= \frac{[R_1COOH][R_2-NH_2]}{[H_2O]} \cdot K_{cond} \\ &= \frac{[R_1COOH][R_2-NH_2]}{[H_2O] \cdot K_{hyd}} \end{aligned} \quad (3)$$

To obtain $R_1-CO-NH-R_2$ with a good yield by condensation reaction by starting from R_1-COOH and R_2-NH_2 , it is effective to decrease the concentration of water by adding organic solvents to the reaction system concurrently by increasing the concentrations of these substrates, as evident in the equation (3).

However, to investigate efficient condensation reaction of enzyme in an aqueous solution not containing organic solvent is considered to be of significance in various aspects, e.g. safety in the food and pharmaceutical fields.

2. Characteristics of subsites

One of the essential points for producing efficient condensation reaction is the enzyme to be selected, and it is considered that, when synthesis of a specific peptide is attempted, the characteristics of the subsites at the active site of the enzyme which catalyzes the synthesizing reaction exerts a large influence on the synthesizing reaction. For example, to carry out synthesis of tetrapeptide (X-Y-X-Y) from dipeptide (X-Y), it is presumed to be necessary that either subsites (S_2 and S_1) or subsites (S_1' and S_2') and both of them of the active site of protease must have adequate affinities for X-Y (Fig. 1). Efficient condensation reaction can be expected also in aqueous solution if an enzyme with subsites suitable for synthesis of a specific peptide is obtained.

3. Screening of microorganisms which produce protease with potent condensation reaction

A screening was made widely of the microorganisms which exhibit a remarkable condensation reaction in aqueous solutions. As yardsticks for the screening, measurements were made, of turbidity-forming activity (TA) by plastein reaction and proteolytic activity (PA) by the use of milk casein as a substrate, and the ratio of the two activities (TA/PA) was found. As a result, obtained was *Streptomyces cellulosa* as a strain which produced protease with a large ratio. The protease SCC produced by this bacterium has a weak milk casein degradation activity, compared with enzymes of various origins, and when soybean protein hydrolysate was used as substrate, a sudden increase in the turbidity was observed at the initial stage of the reaction, showing a behavior quite different from those of the proteases of various origins used as control (Fig. 2). From this finding, it was presumed that, regarding the synthesis of peptide, the protease produced by this bacterium is more specific than the enzymes of other origins.

4. Action of protease SCC on dipeptide

Reaction was carried out by the use of various dipeptides with high concentrations as substrates to elucidate the reactive specificity of protease SCC in peptide synthesis. As a result, when Phe-Val, Phe-Val and Leu-Met which are the dipeptides consisting of hydrophobic amino acids were used as substrates, a remarkable turbidity was caused in the reaction solution due to the reaction of this enzyme, and precipitates were produced. As a result of making various analyses of amino acid compositions and of N-terminal amino acid and C-terminal amino acid, it was found that the structure of the precipitates produced from Phe-Val was $(\text{Phe-Val})_2$ and those of the products from Val-Phe and Leu-Met were $(\text{Val-Phe})_2$, $(\text{Val-Phe})_3$ and $(\text{Leu-Met})_2$, $(\text{Leu-Met})_3$, respectively. On the other hand, when dipeptide consisting of hydrophilic amino acid and hydrophobic amino acid, eg. Leu-Gly, was used as substrate, $(\text{Leu-Gly})_2$, (P_{LG1}) and $(\text{Leu-Gly})_3$, (P_{LG2}) were synthesized, but no turbidity or precipitation as above was observed in this case at all.

Next, a comparison was made between the syntheses with P_{LG1} and P_{LG2} by this enzyme and those of proteases of other origins (Table 1). If the value of $(P_{LG1} + P_{LG2})/PA$ is looked at, it was found that protease SCC showed a large value, being an enzyme with a potent competence of synthesizing peptide per unit of milk casein decomposing activity.

5. Kinetic studies on the condensation reaction of protease SCC

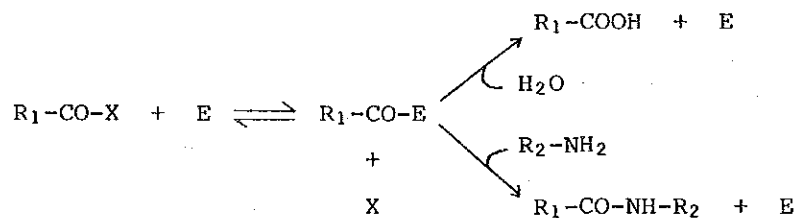
This enzyme synthesizes dimer and trimer from dipeptides in several kinds in aqueous solution by condensation reaction. To elucidate the characteristics of the subsites at the active sites of this enzyme which has such an activity, a kinetic study was made to the condensation reaction.

As a result, dissociation constants were found as 0.65M when Leu-Gly bonds to the subsites S_2 and S_1 at the active site of this enzyme and 0.016M when Leu-Gly bonds to the subsites S_1' and S_2' (Fig. 3).

From the results of this Kinetic study, it was found that the subsites S_1' and S_2' at the active site of this enzyme have a very strong affinity for Leu-Gly, compared with subsites S_2 and S_1 , suggesting it being the main cause for the remarkable occurrence of condensation reaction for synthesizing $(\text{Leu-Gly})_2$ and $(\text{Leu-Gly})_3$.

6. Hydrolysis reaction and transfer reaction of protease

As shown in the following formula, a consideration is to be given to the hydrolysis reaction and transfer reaction of protease when substrate $R_1\text{-CO-X}$ was used.



Hydrolysis reaction is completed when the acyl-enzyme ($R_1\text{-CO-E}$) which is produced as an intermediate has undergone deacylation by receiving an attack of water molecule. If $R_2\text{-NH}_2$ exists in the reaction system and makes a more powerful nucleophilic attack than that by water molecule, a transfer reaction by which $R_1\text{-CO-NH-R}_2$ is produced occurs. Here, the rate of transfer reaction depends largely on the mode of bonding to fragment X_1 , and bonding of ester is far faster than the bonding of amide or peptide.

7. Screening of protease with potent transfer reaction

A screening was made of the protease which exhibits a remarkable transfer reaction in aqueous solution. As a yardstick for the screening, measurements were made of the activity (HA) producing phenylalanine hydroxamic acid and proteolytic activity (PH) by the use of milk casein as substrate, and the ratio between the two activities were found. *Streptomyces griseus* var. *alcalophilus* was obtained as a strain which produces a protease with a large ratio. The protease produced by this bacterium was purified and named as protease I.

8. Donor specificity of protease I at transfer reaction

Protease I is a serine protease which exhibits the maximum transfer reaction in the vicinity of neutrality and has a characteristic of synthesizing hydroxamic acid of amino acid from amino acid ester and hydroxylamine.

Therefore, an assessment was made of the donor specificity of this enzyme at its transfer reaction by the use of various amino acid esters and hydroxylamine. As a result, protease I showed a wide donor specificity synthesizing the hydroxamic acid of most of the amino acids with acidity, neutrality and basicity (Table 2). It was considered very hopeful that this enzyme has such characteristics as these when various peptides will be synthesized in future.

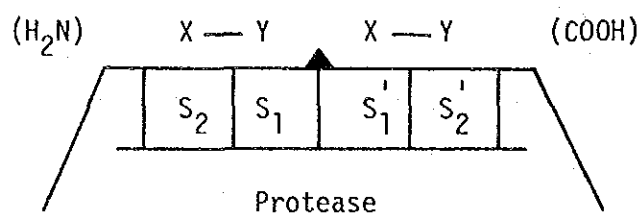


Fig. 1. Binding of dipeptides (X-Y) to active site (subsites) of a protease.

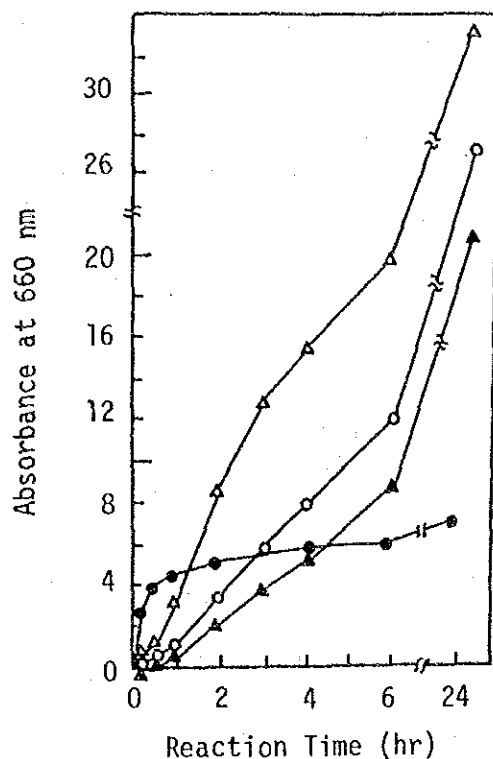


Fig. 2. Turbidity formation from soybean protein hydrolysate by protease SCC from *S. cellulosa* and other proteases.

● , ammonium sulfate-precipitated enzyme from *Streptomyces cellulosa* (60 U); ○ , α -chymotrypsin (60 U); Δ , Biopraxe (*Bacillus subtilis* var. *Bioteucus*) (60 U); ▲ , Prozyme (*Streptomyces* No. 1033) (60 U). The values in parentheses indicate the proteolytic activities of enzymes against milk casein as a substrate. Turbidity was measured at 660 nm.

Table 1. Formations of P_{LG1} and P_{LG2} by various proteases

Protease	Proteolytic	P _{LG1} + P _{LG2} ^{a)} (μM/min)	Ratio of (P _{LG1} + P _{LG2})/PA
	activity (PA) (U/ml)		
Protease SCC (<i>S. cellulosa</i>)	25	250	10
α-Chymotrypsin	1,000	10	1.0 X 10 ⁻²
Papain	1,000	4.2	4.2 X 10 ⁻³
Thermolysin	1,000	13	1.3 X 10 ⁻²
Prozyme (<i>Streptomyces</i> No. 1033)	1,000	49	4.9 X 10 ⁻²
Biopraxe (<i>B. subtilis</i> var. <i>Biotecus</i>)	5,000	0	0
Subtilisin BPN ¹	10,000	0	0
Alkaline Protease (<i>S. griseus</i>)	10,000	0	0
Protease A (<i>A. oryzae</i>)	10,000	0	0
Neutral Protease (<i>S. griseus</i>)	10,000	0	0

a) These values indicate the sum of formation rates of P_{LG1} and P_{LG2} which were produced from 0.2 M L-Leu-Gly at pH 7.0 and 40°C. P_{LG1} and P_{LG2} were measured by HPLC.

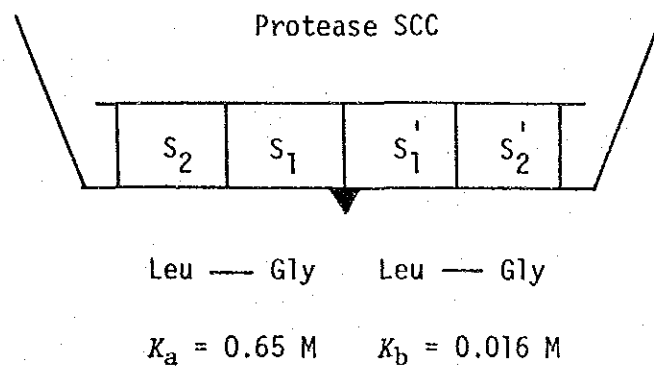


Fig. 3. Binding of Leu-Gly to active site (subsites) of protease SCC and assignment of dissociation constants of Leu-Gly for enzyme-substrate complexes.

Table 2. Formation of various hydroxamic acids by the transfer action of protease I from *S. griseus* var. *alcalophilus*.

The reaction was done at 40°C and pH 7.0, using various esters (donors) containing 0.5 M NH₂OH as substrates. The rate of L-Phe-OEt was taken as 100.

Donor	Concentration (M)	Relative activity	Donor	Concentration (M)	Relative activity
Phe-OEt	0.1	100	Ac-Phe-OEt *	0.04	112
Phe-OMe	0.1	170	Ac-Tyr-OEt *	0.1	267
Tyr-OEt	0.1	297	Ac-Val-OMe	0.1	23
Leu-OEt	0.1	127	Ac-Leu-OMe *	0.1	299
Val-OMe	0.1	10	Ac-Arg-OMe	0.1	37
Arg-OMe	0.1	6	Ac-Lys-OMe	0.1	90
Arg(NO ₂)-OBzl *	0.1	21	Ac-Asp-OMe	0.1	43
Lys-OEt	0.1	13	Ac-Glu- α -OMe *	0.05	165
Asp-di-OBzl *	0.04	76	Ac-Pro-OMe	0.1	0
Glu- α -OBzl *	0.025	66	Bz-Arg-OEt	0.1	13
Glu-di-OBzl *	0.04	37	Bz-Lys-OMe *	0.1	27
Glu-di-OEt	0.1	23	Bz-Ala-OMe *	0.1	29
Glu- γ -OMe	0.1	0	Bz-Gly-OEt *	0.1	14
Ser-OMe	0.1	20	Ac-Gly-Lys-OMe	0.1	43
Gly-OEt	0.1	7	Cbz-Val-Phe-OMe *	0.02	22
Asp-Phe-OMe *	0.033	11	Cbz-Phe-Leu-OMe *	0.02	7
			Cbz-Ser-Leu-OMe *	0.03	88

* Dimethyl sulfoxide (25%) was contained in the reaction mixture.

Ac : Acetyl; Bz : Benzoyl; Cbz : Carbobenzoxy; -OEt : Ethoxy;
-OMe : Methoxy; -OBzl : Benzyloxy.

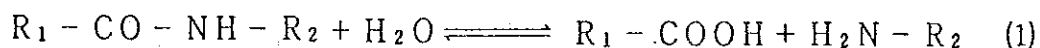
以蛋白酶合成缩氨酸

室 哲雄

蛋白酶本来是作用于蛋白质及缩氨酸等，催化缩氨酸键的水解反应的酶。食品、医药品方面一直使用蛋白酶，极大部分都是利用其水解作用的。例如酿造豆酱、酱油时利用微生物蛋白酶，生产干酪时使用凝乳酶、微生物凝乳酶，生产啤酒时为了防止蛋白质混浊，作为Chillproofing enzyme而使用木瓜酶，在医药方面作为代谢性酶剂而使用蛋白酶。但如果利用其逆反应的缩合反应及转移反应，就能以氨基酸或缩氨酸为出发物质而合成更高聚合度的有用缩氨酸，在食品方面味道的改良、营养的加强、物性的改良、医药方面生理活性缩氨酸的合成等方面，这种作用将成为有效的手段。

1. 蛋白酶的水解及缩合作用

如(1)式所示，蛋白酶对特定缩氨酸键的作用能表示为水解反应及缩合反应。



从上式水解反应及缩合反应而看的平衡常数分别定为 K_{hyd} 及 K_{cond} ，就可得(2)式：

$$K_{hyd} = \frac{1}{K_{cond}} = \frac{(R_1 - COOH)(R_2 - NH_2)}{(R_1 - CO - NH - R_2)(H_2O)} \quad (2)$$

因此

$$\begin{aligned}
 (R_1 - CO - NH - R_2) &= \frac{(R_1 - COOH)(R_2 - NH_2)}{(H_2O)} \cdot K_{cond} \\
 &= \frac{(R_1 - COOH)(R_2 - NH_2)}{(H_2O) \cdot K_{hyd}} \quad (3)
 \end{aligned}$$

从(3)式可知，如要从 $R_1 - COOH$ 及 $R_2 - NH_2$ 出发，以缩合反应高效率地获得 $R_1 - CO - NH - R_2$ ，有效的措施是提高这些基质的浓度，同时把有机溶媒等加在反应系上以降低水的浓度。

从各方面来看，例如从食品或医药品方面的安全性而言，在不含有有机溶媒的水溶液中以酶进行高效率的缩合反应是一件有意义的事。

2. Subsite的特性

要高效率地进行缩合反应，酶的选择也是关键之一。要合成特定缩氨酸时，Subsite在催化该合成反应的酶活性部位上的特性可能对其合成反应给予极大的影响。例如，如图1所示，如要从缩二氨酸($X - Y$)高效率地合成其二聚物的缩四氨酸($X - Y - X - Y$)，就必须酶的Subsite S_2 和 S_1 及 S'_1 和 S'_2 分别或双方对 $X - Y$ 具有适当的亲力。如果找到具有适合合成特定缩氨酸的Subsite的酶，即使在水溶液中也进行高效率的缩合反应。

3. 缩合作用较强的蛋白酶生产菌的检索 (screening)

我们广泛地检索了在水溶液中起显著缩合作用的蛋白酶生产菌。作为检索的标准，测量了塑阮反应的浊度形成力(TA)以及以

milk casein为基质的蛋白分解活性 (PA), 并求出了两者的比例 (TA/PA)。作为能生产此比例较大的蛋白酶的菌株求出了 *Streptomyces cellulosa*。该菌生产的蛋白酶 SCC, 与其它各种起源的蛋白酶相比, milk casein分解活性较弱, 并且以大豆蛋白胍酶分解物作为基质时, 在反应初期观察到了浊度急剧增大, 其变化与对照的各种起源的蛋白酶完全不同 (图 2)。从此可推测对缩氨酸的合成而言, 该菌所生产的蛋白酶的特异性比其它起源的酶为高。

4. 蛋白酶 SCC 对缩二氨酸的作用

为了解明蛋白酶 SCC 在合成缩氨酸时的反应特异性, 以各种高浓度缩二氨酸为基质进行了反应。结果, 如果以由疏水性氨基酸组成的 Phe-Val、Val-Phe 及 Leu-Met 等缩二氨酸作为基质时, 反应液因该酶的作用而显著混浊, 析出了沉淀物。对从 Phe-Val 生成的沉淀物进行了氨基酸组成、N 终端氨基酸及 C 终端氨基酸的分析等各种分析, 结果: 其结构是 (Phe-Val)₂, Val-Phe 及 Leu-Met 的生成物分别为 (Val-Phe)₂ 和 (Val-Phe)₃ 及 (Leu-Met)₂ 和 (Leu-Met)₃。另一方面, 如果以由亲水性氨基酸及疏水性氨基酸组成的缩二氨酸, 例如 Leu-Gly 等作为基质时, 就有 (Leu-Gly)₂ (P_{LG1}) 及 (Leu-Gly)₃ (P_{LG2}) 合成出来, 但此时完全没有上述混浊或沉淀现象。

关于以该酶合成 P_{LG1} 及 P_{LG2}, 与其它起源的蛋白酶进行了比较 (表 1)。看 (P_{LG1} + P_{LG2})/PA 值, 蛋白酶 SCC 较大, 可知蛋白酶 SCC 是每单位 milk casein 分解活性的缩氨酸合成力较强的酶。

5. 有关蛋白酶SCC缩合反应的速度论性分析

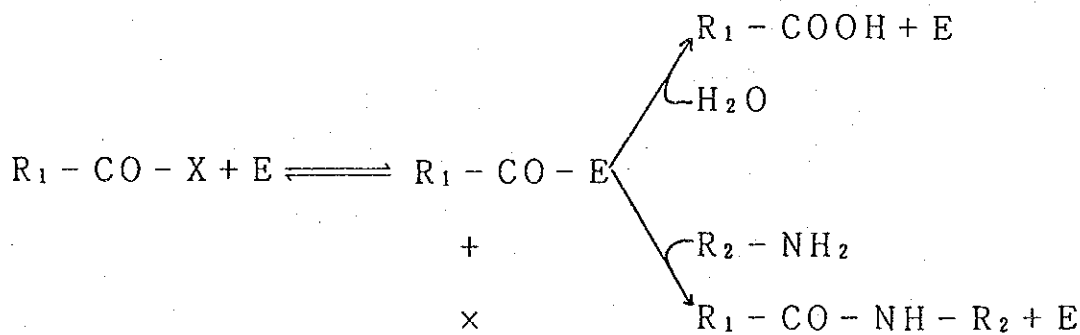
本酶在水溶液中从几种缩二氨酸，通过缩合反应合成出其二聚物、三聚物。为了解明本酶活性部位的subsite特性，进行了速度论性分析。此时把重点放在缩合反应上。

结果，如图3所示，Leu-Gly结合于本酶活性部位的subsite S₂及S₁时的离解常数为0.65M，Leu-Gly结合于subsite S'₁及S'₂时的离解常数为0.016M。

从这些速度论性分析的结果可知本酶活性部位的subsite S'₁及S'₂对Leu-Gly的亲力远比subsite S₂及S₁为大，可认为此事是合成 (Leu-Gly)₂及 (Leu-Gly)₃ 的缩合反应显著的主要原因。

6. 蛋白酶的水解作用及转移作用

如下式所示，现在研究一下以R₁-CO-X为基质时的蛋白酶的水解反应及转移反应。



水解反应是作为中间体生成的酰化酶 (R₁-CO-E) 受到水分子的攻击而脱酰化而完成的。如果在该反应系上有R₂-NH₂存在而进行比水分子更强力的亲核攻击，就引起R₁-CO-NH-R₂生成

的转移反应。在此，转移速度密切相关于与 fragment X 的键形式。如果是酯键，就远比酰胺键或缩氨酸键为快。

7. 转移作用较强的蛋白酶的检索 (screening)

我们检索了在水溶液中起显著转移作用的蛋白酶。作为检索的标准，测量了苯基丙氨酸的氧肟酸生成力 (HA) 及以 milk casein 为基质的蛋白分解活性 (PA)，并求出了两者的比例 (HA/PA)。结果作为能生产此比例较大的蛋白酶的菌株求出了 *Streptomyces griseus* var. *alcalophilus*。将该菌所生产的蛋白酶提纯，命名为蛋白酶 I。

8. 在转移反应上蛋白酶 I 的给予体特异性

蛋白酶 I 是在中性附近呈现出最大转移活性的丝氨酸蛋白酶 (serine proteinase)，其特征是从氨基酸酯及羟胺合成氨基酸的氧肟酸。

因此，使用各种氨基酸酯及羟胺研究了该酶在转移反应上的给予体特异性。结果，蛋白酶 I 呈现出广泛的给予体特异性，能够合成酸性、中性、碱性的几乎所有的氨基酸的氧肟酸 (表 2)。本酶具有这种特性，今后合成各种缩氨酸时非常有利。

Status of Enzyme Technology in Thailand

Dr. Jiraporn Sukhumavasi

Thailand Institute of Scientific and Technological Research

BACKGROUND OF THAILAND

A. SOCIAL AND ECONOMIC BACKGROUND

Thailand is a small, developing country in the tropical Southeast Asian region with a population of 54 million people in an area of approximately 514,000 km². The majority of people live in rural areas as farmers. The per capita GNP (1986) is approximately U.S.\$810. The agricultural sector is the most important sector in terms of employment and foreign-exchange earnings. Thailand has been and continues to be a world-leading exporter of agricultural products, notably rice, cassava and cassava products, natural rubber, and maize, which currently constitutes about 27% of her exports³. During the past several years, Thailand has enjoyed a relatively high growth rate in the economy, with an average of approximately 6% in real terms. Much of the economic growth, however, can be attributed to the fast-expanding industrial sector, particularly in agroindustry, which is expected to overtake the agricultural sector in terms of contribution to GNP⁴.

It should be emphasized that Thailand, which is traditionally regarded as an agricultural country with a considerable surplus of agricultural products for export, now intends to move toward industrialization within the next 10 years. The country plans to become a newly industrialized country (NIC) by the end of the Seventh Five-Year National Economic and Social Development Plan (1992-1996). Major areas of industrial development to be given priority include agroindustry, energy, engineering, and the restructuring of industry⁵. Where industrial restructuring is concerned, it is felt that the country has now reached its optimum point on the primary production level, and it must be upgraded to manufacturing a higher level of high-valued intermediate and finished products, particularly for export.

Factors favorable for the potential application of biotechnology in Thailand include the following:

1. Thailand is a fertile country with a vast pool of as yet underutilized natural bioresources with which to develop into useful and marketable high value-added products.
2. Thailand has, for a developing country of her size, a critical mass of qualified scientific and technological personnel for biotechnology R&D as well as a skilled labor force⁶.
3. Thailand advocates free enterprise with relatively sound economic and political status despite the world recession and political crisis⁷.

B. BIOTECHNOLOGY DEVELOPMENT IN THAILAND: HISTORICAL PERSPECTIVES

Development of biotechnology in Thailand can be viewed in a historical perspective as arising from the growth of both the supply and demand sides of the technology. From the supply side, the last 2 decades, in particular, have seen a remarkable growth and maturity of basic life sciences in Thailand, linked with the emergence of a critical mass of scientists trained in developed countries and the establishment of research-based graduate schools that have been responsible for the presence of substantial endogenous research capability. From the demand side, problems in health, agriculture, and rapidly expanding agroindustry have made it necessary to utilize biotechnology at various levels of sophistication and complexity⁴.

Major developments contributing to the growth of endogenous R&D capability include the following:

1. The Regional Network for Microbiology in Southeast Asia

Established in 1975 under the auspices of UNESCO, the network comprises Australia, Hong Kong, Indonesia, Japan, the Republic of Korea, Malaysia, New Zealand, the Philippines, Singapore, and Thailand. The main objective of the network is to strengthen research and training in microbiology and its application in agriculture, health, industry and the protection of the environment, with the aim of raising the standard of living in the developing countries. Thailand's participation in the network has helped markedly in improving the standard of microbiology and biotechnology in the country, in terms of both quantity and quality. During the first 10 years of its existence (1975 to 1984), over 500 young scientists, including 80 from Thailand, were trained in the areas of basic and applied microbiology⁸. Topics of the training program have continually evolved from the initially broad topics of microbiology to more specialized areas introducing front-line topics and state-of-the-art technology, such as bioenergetics and fermentation kinetics, genetic engineering, and immobilized enzymes and cells.

The fact that within the network region are three developed countries, Japan Australia, and New Zealand, made it possible to establish contacts with distinguished scientists in a wide range of fields.

For program activities hosted in Thailand, additional experts from outside of the region are usually invited, notably from the U.K., U.S.A. and particularly Japan.

2. JSPS-NRCT Cooperative Research Program

Active participation by the Japanese government and several leading Japanese scientists had led to more close cooperation between Thailand and Japan under the auspices of the Japanese Society for the Promotion of Sciences in 1978⁹. Given high priority under the program is the cooperative research in the area of microbial technology that later evolved into biotechnology. A total of 8 Thai universities and 13 Japanese universities and research institutions have participated in the program with the International Center of Cooperative Research in Biotechnology, Japan, Osaka University serving as a core organization. The program allows for study visits, technical seminars, and cooperative research, some of which have served as Ph.D. research for Thai scientists. Up to 1987, over 150 Thai scientists have been involved in the program.

3. International Postgraduate University Course in Microbiology + *Biotechnology*

Since 1973, the course was set up as one of the international long-term postgraduate courses as a part of UNESCO activities in the field of natural sciences for the promotion of fundamental research through the organization of training courses, especially designed for scientists and research workers from developing countries. This 1-year course is organized by the Japanese National Commission for UNESCO, Osaka University, Tohoku University, the University of Tokyo, Kyoto University, and Kyushu University, with the support of the Japanese government, UNESCO, and ICRO. The purpose of the course is to provide the participants with a more profound education as well as a methodological preparation for their own research or educational activities in the field of general and industrial microbiology.

During the past 12 years, 167 young scientists from Asian countries, including 31 from Thailand, have completed the course⁸.

C. STATUS OF ENZYME TECHNOLOGY

Thailand imports substantial amounts of enzyme each year. In 1988, the pure enzyme was imported about 70 million bahts and more than 10 million bahts in the form of crude enzyme. For starch degradative enzymes (amylase and amyloglucosidase for syrup, glucose brewery and textiles) alone, the volume that was imported in 1988 was reported to be at the value of about 30 million baht. Other industrial enzymes that were imported in large amounts are the proteolytic enzymes which are employed in the tanning and detergent industries. With the rapid increase in knowledge in biotechnology it can easily be predicted that the use of enzymes will increase tremendously both in the industry as well as in health-care sectors.

The demand for enzymes in Thailand, although very substantial with a very bright future, is at present not large enough for them to be economically produced at a full industrial scale. Accordingly, there are attempts at a number of research laboratories to employ non-conventional methods for production of industrial enzymes (1, 2, 3) with particular emphasis on production of amylase and amyloglucosidase. With the new development in biotechnology and genetic engineering for improvement of microbial strains it is hoped that within the very near future, enzyme production will be a major contribution to the industrial sector in Thailand. Besides amylases and proteases, other enzymes such as cellulases (4, 5), penicillin acylase (6), xylanases and pectin depolymerases do have great potential for future usage in the industrial sector. However, research in these areas is still in laboratory scale.

It appears that with the consideration of the local market size as well as the availability of the existing technology, there exists very good possibility in developing capability in Thailand for production of industrial enzymes such as glucoamylase. As such, this study is initiated to search for the most appropriate techniques for development of glucoamylase producing industry in Thailand.

Quantity and Value of imported enzymes in 10 years

YEAR	Quantity, kg.	Value, bahts
1979	52,767	13,373,666
1980	112,721	17,247,764
1981	103,674	19,336,595
1982	152,359	15,940,106
1983	219,147	26,413,496
1984	258,471	34,632,272
1985	373,411	47,595,425
1986	319,629	31,562,925
1987	406,733	42,503,945
1988	725,361	66,475,993

Source: Customs Department ('79-'88)

Materials and Methods

Growth of microorganisms

The growth and cultivation of *Aspergillus niger* were carried out as described previously (1). Spore inoculum was prepared as described by N. Lotong and P. Suwanarit (7).

The tray cultures were prepared by mixing 1 Kg wheat bran with 1 liter of water, sterilizing for 30 min., mixing with spore inoculum and putting in 2 ft x 2 ft aluminum trays, and then inoculated for 48 hr in humidity and temperature controlled room.

Extraction of enzymes

The enzymes were extracted by using the method of S.C. Dharmathiti (8).

Concentration of enzymes

The enzymes preparations were concentrated either in UF stirred cell using various membrane types or in UF of DDS-35 at 4 Bar pressure and GR 51PP membrane.

Hydrolysis of starch was carried out in 1 liter Bio-reactor and was performed according to the details provided by the producers.

Results and Discussion

Selection of appropriate strains of *Aspergillus niger*

Intensive screening programs was initiated to search for suitable fungal strains for production of glucoamylase. The criteria for selection were as follows, the strain must have very fast growth rate, must have high glucoamylase productivity, and must not produce or produce at very low

level of transglucosidase. After examining more than thirty different strains of *Aspergillus niger* obtained from various culture collections both in Thailand and overseas, two strains were selected for future study. The first strain, *A. niger* MUCA was found to be suitable for production of glucoamylase using solid substrate cultivation technique. This strain, under certain defined condition, produced very low level of conidia. This character was found to be highly suitable for growth under solid substrate fermentation. The second strain, *A. niger* KUB-1 was found to be very suitable for production of glucoamylase under submerged cultivation technique. The following sections of this paper will describe only the results of the work on production of glucoamylase from *A. niger* MUCA by solid substrate fermentation. The results on the utilization of submerged fermentation will appear elsewhere.

Optimization of *A. niger* MUCA for production of glucoamylase

Series of experiments were conducted in 500 ml Erlenmeyer flask cultures to determine the appropriate medium composition as well as conditions for optimal methods for production of glucoamylase by *A. niger* MUCA. It was found that the best medium was that employed wheat bran as the major raw material. The best condition for production of glucoamylase was obtained when the moisture was maintained at 50-60 percent and the temperature at 30°C. When the fermentation process was scale-up by using plastic bag and eventually trays cultures, there were considerable reduction in the production of glucoamylase. As shown in Table 1, the level of enzyme produced was 569 Units/gm substrate in plastic bags culture, where 2 kilogram of substrate was employed. The level of enzyme produced was reduced further to 486 Units/gm substrate in tray cultures where 2 kilograms of

Table 1. Enzyme production in plastic bag culture.

MEDIUM		PLACEMENT OF PLASTIC BAG	FINAL MOISTURE CONTENT (%)	ACTIVITY* (μMOLE/GH)
WB (KG)	DW (L)			
1.5	1.5	HORIZONTAL	60	269
1.5	1.5	VERTICAL	61	250
1.0	1.0	HORIZONTAL	64	569
1.0	1.0	VERTICAL	62	338

* ACTIVITY OF NON-INOCULATED WHEAT BRAN = 4 μMOLE/GH

substrate was employed. The data shown in Table 2 appeared to indicate that the inability to maintain rather constant level of moisture content in the tray cultures might be major factor causing reduction in the production of glucoamylase. Of course, there might be other factor(s) involved in causing the reduction in the enzyme level. More work need to be undertaken in identifying this factor(s).

Table 2. Enzyme production in tray culture.

MEDIUM		INITIAL MOISTURE	FINAL MOISTURE	ACTIVITY*
WB (KG)	DW (L)	CONTENT (%)	CONTENT (%)	(μ MOLE/GH)
1.0	1.0	59	28	53
			32	158
			36	227
			42	398
			45	486

* ACTIVITY OF NON-INOCULATED WHEAT BRAN = 4 μ MOLE/GH

Extraction of glucoamylase from tray cultures

After experimenting with a number of extraction methods with various different solvent systems, the best method for extracting the enzymes was by eluting the koji from column with water. As described in the Materials and Methods section, suitable systems could be easily developed to carry out repeated extracting method. Thus, by using repeated extraction procedure as high as 587 units/ml of glucoamylase preparation could be obtained (Table 3).

Table 3. Extraction of glucoamylase.

NO. OF EXTRACTION	ENZYME ACTIVITY (UNIT/ML)
1	120
2	185
3	208
4	240
5	291
6/7/8	362
9	432
10	552
11	585
12	587

Concentrating of glucoamylase by using ultrafiltration

The repeated extracted solution of glucoamylase was then subjected to further concentrating step by using ultrafiltration technique. In routine operations using 60 L of extract, about 10 folds concentrated preparation could be achieved (Table 4), however, data by extrapolation indicated that as high as 18 folds concentration of original extracts might be able to obtain, if larger volume of the extracts were to be employed.

Table 4. Concentration of glucoamylase using ultra-filtration.

PREPARATION	PROTEIN (MG/ML)	ACTIVITY (UNITS/ML)
CRUDE ENZYME	131	363
CRUDE ENZYME AFTER CENTRIFUGED	139	357
CONCENTRATE	249	2466
FILTRATE	95	33

Hydrolysis of starch using concentrated preparation of glucoamylase.

The concentrated enzyme preparation was mixed with starch slurry which was previously hydrolyzed with commercial preparation of α -amylase. The data as shown in Table 5, showed that the conversion efficiency (NG) from starch to glucose obtain was 88%. This value was comparable to the one obtained (92%) from commercial preparation of glucoamylase (SAN).

Table 5. Production of glucose syrup using α -amylase and glucoamylase.

<u>SUGAR CONTENT</u>	<u>SAN</u>	<u>NG</u>
HYDROLYSATE	2,040	1,900
CONVERSATE	2,224	2,156
CONVERSION EFFICIENCY	92%	88%

Thus, production of glucoamylase appeared to be technically possible, however, the processes developed and described in this paper still need to be evaluated in view of the cost-effectiveness of the process.




Acknowledgement



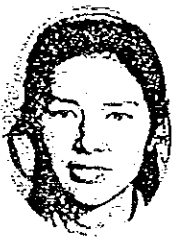

This research was supported by the JSPS-NRCT Cooperative Programs and the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Thailand.



References





- 1) Bhanibhannon, O.: Thai J. Agric. Sci., 16, 173 (1983).
- 2) Vongsuvanlert, V., Kumnuanra, J., Tani, Y.: Microbial Utilization of Renewable Resources, 3, 49 (1983).
- 3) Pichyangkura, S., Suratanakavikul, H., Nagai, S., Taguchi, H.: Microbial Utilization of Renewable Resources, 1, 141 (1980).


- 4) Limtong, S., Seki, T., Kinoshita, S., Taguchi, H., Kumunta, J.: Microbial Utilization of Renewable Resources, 2, 72 (1981).
- 5) Chavanich, S., Yoshioka, H., Hayashida, S.: Microbial Utilization of Renewable Resources, 2, 72 (1981).
- 6) Meevootisom, V., Somsak, P.: J. Sci. Soc. Thailand 9, 143 (1983).
- 7) Lotong, N., Suwanarit, P.: Appl. Environ. Microbiol., 39, 430 (1982).
- 8) Dharmsthiti, S.C., Flegel, T.W., Dhuniratanana, A.: ASEAN Food Jr. 2, (in press) (1986).





1981	 <p>中 国</p>	<p>Mr. Zhang Xing-yuan (張 星 元)</p> <p>Graduate Student, Wuxi Institute of Light Industry</p> <p>無錫輕工業學院 學生(大學院 レベル)</p> <p>October 19, 1946 (34才)</p>	<p>Office: Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi, Jiangsu, China</p> <p>Home: 34 Sijing Lane, Suzhou, Jiangsu, China</p>
1981	<p>中 国</p>	<p>Mr. Yuan Song Lin (阮 松 林)</p> <p>Shanghai Municipal Institute of Industrial Microbiology</p> <p>上海工業微生物學院</p> <p>December 1936 (44才)</p>	<p>Office: Shanghai Municipi- pal Institute of Industrial Microbiology</p> <p>Home: No 60 Lane 1209 Xin-Zha Road, Shanghai, China</p>
1982	 <p>中 国</p>	<p>Mr. Far-chang Lu (盧 法章) Technician, The North- east General Pharmaceuti- cal Factory</p> <p>東北製藥工廠 微生物學研究員</p> <p>January 26, 1942</p>	<p>Office: The North-east General Pharmaceutical Factory, Shenyang, China</p> <p>Home :Ditto</p>
1983	 <p>① P/No 8205528 ② 中 国 (Chinese)</p>	<p>③ Mr. Tao Wen-yi (陶 文 謙) タオ ④ 無錫輕工業學院 食品科學科 講師(工業発酵)</p> <p>Lecturer in the Field of Industrial Fermentation, Dept. of Food Science in the Wuxi Institute of Light Industry</p> <p>⑤ Nov. 17, 1947</p>	<p>⑥⑦: office & Home Wuxi Institute of Light Industry Wuxi, Jiangsu, China .</p>



1984	 <p>① P/No. 8305124 ② 中国 (Chinese)</p>	<p>③ Miss <u>Feng</u> Xiaopeng フェン 小朋 ④ Assistant Engineer, Henan Biology Institute 河南省科学技术委员会 生物研究所 アシスタントエンジニア ⑤ Sept. 17, 1962</p>	<p>⑥ : Henan Biology Institute, Zhengzhou, Henan Province, China ⑦ : Henan Biology Institute, Zhengzhou, Henan Province, China</p>
1985	 <p>① p/No. 8405265 ② 中国 Chinese</p>	<p>③ Mr. <u>Wang</u> Jitang ワン 王 ④ 遼寧大學講師(酵素工学) Lecturer, Liaoning University (Enzyme Lab.) ⑤ January 25, 1946</p>	<p>⑥ Shenyang (瀋陽) China ⑦ Room 107, Building 5, Liaoning Univ., Shenyang China ⑧ 生物化學修士(酵素工学)遼寧大學 ('82) M. Sc in Biochemistry (Enzymology) Liaoning Univ. ('82)</p>
1986	 <p>① P/No. 8506023 ② 中国 China</p>	<p>③ Miss <u>Yang</u> Ping (楊萍) ヤン ④ 雲南省 微生物研究所 研究員補 Assistant Researcher Microbiology Institute of Yunnan ⑤ June 11, 1960</p>	<p>⑥ Microbiology Institute of Yunnan, China ⑦ 7, Bai Men Street, Kunming, Yunnan, China 雲南省昆明市北門路7 ⑧ 微生物學士, 雲南大學 B. Sc. (Microbiology) 82 Yunnan University</p>
1988	 <p>中国 China</p>	<p>② Mrs. <u>Xiang</u> Pei シャン ③ Assistant Engineer of Technology Beijing General Winery 北京釀酒總合工場 副技師 ④ Beijing Institute of Chemical Engineering (B. of Chemical Engineering) ⑤ July 24, 1962</p>	<p>⑥ No179, Jian Tian Guo Road, Chao Yang District Beijing, China ⑦ No27, Xi Jiao Min Xiang Street, West District, Beijing, China</p>

1989	 <p>中国 China</p>	<p>② Mr. Jin-die <u>Chen</u> チェン</p> <p>③ Engineer Ningxia Metrology Research Institute ニンシャ計量研究所 技師</p> <p>④ Zhejiang University (B. Sc.) ・ゼジャン大学</p> <p>⑤ Sep. 16, 1957 (31才)</p>	<p>⑥ No. 8 Park Street Yinchuan, Ningxia, China (P.R.C)</p> <p>⑦ - ditto -</p>
1990	 <p>中国 China</p>	<p>② Mr. Jiang, Jun 姜軍 ジヤン</p> <p>③ Engineer, Project Official of Science & Technology, Sparks Project Office, Liaoning Province 遼寧省科委星火弁公室 技師</p> <p>④ Inst. of Forestry & Soil Sci., Academia Sinica (M.Sc) 中国科学院林業土壤研究所卒 専攻: 汚染生態学 (修士)</p> <p>⑤ Aug. 25, 1957 (32才)</p>	<p>⑥ 2. Block 1, San Hao St, Shenyang, Liaoning Prov., P.R. China</p> <p>⑦ -Same as above- 同上</p>

1978	 <p>タイ</p>	<p>Mrs. <u>Jiraporn Sukhumavasi</u> จีราพอรน์ ◦Senior Experimental Scientist 上級実験科学者 ◦Applied Scientific Research Corporation of Thailand タイ国応用科学研究公社 1941年5月21日生 (37才)</p>	<p>Office: 196 Phahonyothin Rd., Bang Khen, Bangkok 9, Thailand Home: 632 Friendship Village, Sukhumvit 77, Prakanong, Bangkok 11</p>
1980	 <p>タイ</p>	<p>Miss Metanee Sukontarug Scientist 5, Department of Science Service, Ministry of Science, Technology and Energy May 28, 1949 (30才)</p>	<p>Office: Rama VI Road, Bangkok 4, Thailand Home: 584 Techavanit Road, Bangkok 8, Thailand</p>
1981	 <p>タイ</p>	<p>Dr. Thanit Pewnim Lecturer & Researcher, Department of Biology, Silpakorn University シルパコン大学 生物学科 講師 July 22, 1952 (28才)</p>	<p>Office: Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakornpathom Thailand Home: Flat G/6A, Silpakorn University, Nakornpathom, Thailand</p>
1981	 <p>タイ</p>	<p>Mrs. Sirirat Sarawek Lecturer & Research Supervisor in Biochemistry, Chemistry Department, Chiang Mai University チェンマイ大学 化学科 講師 November 18, 1945 (35才)</p>	<p>Office: Chemistry Department, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand Home: 130/14, Angkaew Village, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand</p>

	1982		<p>Miss Molsiri Veerothai モンスイリ Lecturer, Home Economics Department, Faculty of Science, Srinakarinwirot University スリナカリンウィロト大学 理学部家政学科講師</p> <p>March 24, 1953</p>	<p>Office : Home Economics Department, Faculty of Science, Srinakarinwirot University, Bangkok, Thailand Home : 19/2 Klong- Prakanong, Suanluang, Bangkok, Thailand</p>
	1983		<p>① Miss Aree Shuvisitkul アリー ② 科学・技術・エネルギー省 科学サービス部 研究員 (グレード: 5) Scientist 5, Department of Science Service, Ministry of Science, Technology & Energy ③ Oct. 1, 1950</p>	<p>⑥ : Department of Science Service, Rama VI Road, Phyathai Bangkok 10400, Thailand ⑦ : 244 Soi Sapanayao, New Road, Bangkok 10500, Thailand</p>
	1984	 <p>① P/No. 8304952 ② タ 1 (Thai)</p>	<p>③ Mrs. <u>Siriporn</u> スリポーン Stonsaovapak ④ Scientist 4, Department of Science Service, Ministry of Science, Technology and Energy 科学・技術・エネルギー省 科学サービス部 研究員 (グレード 4) ⑤ Sept. 26, 1953</p>	<p>⑥ : Department of Science Service, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand ⑦ : 65 Soi Thewarat, Bangkok-Nontaburi Road, Bangkok 10800, Thailand</p>

1985	 <p>① p/No. 8405243 ② タイ Thai</p>	<p>③ Miss <u>Vilai Santiopasri</u> ヴィライ</p> <p>④ カセサート大学理学部 化学科助手 Assistant Professor, Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Kasetsart Univ.</p> <p>⑤ February 20, 1946</p>	<p>⑥ Kasetsart Univ. Bangkhen, Bangkok 10900, Thailand</p> <p>⑦ 8/35 Soi Sena-nikom 2 Paholyothin Rd., Bangkhen Bangkok, 10900 Thailand</p> <p>⑧ 博士(農芸化学) フィリピン大学('81.) Ph.D(Agricultural Chemistry), Univ. of the Philippines('81)</p>
1986	 <p>① P/No 8505820 ② タイ Thailand</p>	<p>③ Mr. <u>Suntud</u> サンタット Sirianuntapiboon</p> <p>④ タイ科学・技術研究所 研究員 Junior Researcher (Biotech. and Enzymology) Thailand Institute of Scientific and Technologi- cal Research</p> <p>⑤ January 4, 1958</p>	<p>⑥ 196, Phahonyothin Rd. Bangkok 10900, Thailand</p> <p>⑦ 116/58 Rangnum Rd. Phayathai, Bangkok 10900 Thailand</p> <p>⑧ 工業微生物学修士, チュラロン コン大 M. Sc. (Industrial Microbiology) '85 Chulalongkorn University</p>
1987	 <p>タイ THAILAND</p>	<p>Mrs. <u>Phen Thongnoi</u> ベン</p> <p>Researcher, Food Analysis Div. Dept. of Medical Sciences 医科学部 食品分析課 研究員</p> <p>Chiangmai Univ. (1972-1975)</p> <p>August 31, 1953 (33)</p>	<p>Yod-se, Bangkok 10100, Thailand</p> <p>17/69, Soi Judsun 2521, Suanpug road talingchun Bangkok 10170 Thailand</p>
1988	 <p>タイ Thailand</p>	<p>② Miss <u>Sajee Suwansri</u> サジー</p> <p>③ Medical Scientist, Food Analysis Division, Department of Medical Science 医科学部 食品分析課 研究員</p> <p>④ Chulalongkorn University (M.Sc. in Food Technology)</p> <p>⑤ October 12, 1957</p>	<p>⑥ Yod-se, Bangkok 10100 Thailand</p> <p>⑦ 95 Soi Tinnakorn, Din Dang Road 1, Phyatai Bangkok 10400, Thailand</p>

<p>1989</p>	 <p>タイ Thailand</p>	<p>② Ms. <u>Chantana Thumveerapong</u> チャンタナ</p> <p>③ Medical Scientist Division of Drug Analysis Department of Medical Sciences 医科学省薬品分析部 医科学専門員</p> <p>④ Chulalongkorn University (M. Sc in Pharmaceutical Chemistry) チュラロンコーン大学</p> <p>⑤ June 10, 1955 (33才)</p>	<p>⑥ Yose Bangkok Thailand 10100</p> <p>⑦ 42/14, Tivanon Road Nontaburi Thailand 11000</p>
<p>1990</p>	 <p>タイ Thailand</p>	<p>② Ms. <u>Duanthanorm</u> ドゥアンサノーム Thawaranantha</p> <p>③ Medical scientist 5, Radioisotope lab. section, Dept of Medical Sciences, Ministry of Public Health 厚生省医科学局 ラジオアイソトープ 研究所 医科学技術者 5</p> <p>④ Mahidol University Biochemistry (M. Sc.) マヒドール大学卒 専攻: 生化学(修士)</p> <p>⑤ Mar. 23, 1959 (31才)</p>	<p>⑥ The National Institute of Health, Dept of Medical Sci, Soi Bamrasnaradura Hospital, Nonthaburi Thailand</p> <p>⑦ 53-487 Krisadanakorn Chengwatana Rd., Pakkred, Nonthaburi Thailand</p>

国別年度別受入実績表

回数 国名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	合計
	53	55	56	57	58	59	60	61	62	63	平成 元年	平成 2	
	'78	'80	'81	'82	'83	'84	'85	'86	'87	'88	'89	'90	
バングラディッシュ	1												1
ビルマ						1		1					2
インド	1												1
インドネシア	1				1				1	1		1	5
フィリピン	1	1					1		1				4
スリランカ								1					1
タイ	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13
中国			2	1	1	1	1	1		1	1	1	10
韓国									1	1		1	3
イラク										1	2		3
イラン												1	1
ブラジル		1		1	2	1	2	1		1			9
チリ				1									1
コロンビア		1	1			1							3
コスタリカ				1									1
ユーゴスラビア									1				1
トルコ											2		2
合計	5	4	5	5	5	5	5	5	5	6	6	5	61

