

総 説

生体触媒の化学工業への導入

長 澤 透

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Introduction of Biocatalysis into Chemical Industry

Toru Nagasawa

(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

Microbial processes for industrial production of commodity chemicals are rapidly gaining practical significance for preparation of high purity products, in an environmentally acceptable manner, while realizing energy savings. The use of bacterial nitrile hydratase for industrial production of the important chemical, acrylamide, was recently pioneered in Japan. We review here the enzymatic production of acrylamide and recent progress in the production of other commodity chemicals through microbial processes.

Key words : biocatalysis, commodity chemicals, nitrile hydratase, acrylamide, microbial process

1. はじめに

今日のバイオインダストリーは、アルコール発酵をはじめとする醸造発酵工業に端を発していると言えよう。発酵工業は、アルコールから有機酸(酢酸、クエン酸など)、有機溶媒(アセトン、ブタノールなど)の生産を目的とする化学工業へと発展していった。そしてペニシリンの発見とその発酵生産法の確立が契機となって微生物利用技術は大きく躍進、発展を遂げた。その後、微生物利用工業は勢いついた潮流となって抗生物質、アミノ酸、核酸という3つの大きな山を乗り越え、工業として確固たる地位を築くに至る。これらの成果を通して、微生物利用工業は専らファインケミカルズの生産を対象とする特徴を呈した。従来より、微生物を用いた生産法は化学合成法を凌ぐ場合や競合する事態もしばしばあった。しかし1950年以降の石油化学工業の著しい発展に伴い、大量生産型の化成品を対象とする化学工業においては微生物利用技術は大した意味を持たなくなっていった。しかし、最近になり、微生物反応を化学工業に積極的に導入し、利用しようとする試み

が盛んになってきた。これは微生物を触媒として用いる培養、反応系は効率および特異性において化学反応を凌駕し、生成物の純度が高いこと、反応が常温、常圧の温和な条件で行われ環境適応型プロセスであること、生産プラントがコンパクトであり、効率的な省エネルギー型プロセスであることなどに因ることが挙げられる。また今日の地球環境問題を考える時、バイオプロセスは化学工業において、新たな意義を見いだしつつある。さらに遺伝子組み替え技術の著しい発展により、従来の障壁に突破口を開く可能性も具体化しつつある。しかしながら、バイオプロセスの開発は時間がかかるのを常としており、実際の工業化例はまだ数少ない。バイオプロセスによってたとえ有用物が生産できても、従来の化学合成プロセスに比べて経済的利点があるのか、新たな設備投資をしてでも採用すべきプロセスなのか、が常に問題となる。本報では、生体触媒を用いた最近の代表的な工業化研究が紹介されている。またここで微生物生産の化学工業における位置付けを概略

Received October 4, 1995

して述べ、筆者が長年取り組んできた典型的な大量生産型化成品、アクリルアミドの工業生産の開発研究を紹介しつつ、化学工業における生体触媒の問題点と展望を述べてみたい。

2. 大量生産型発酵生産物

微生物は抗生物質、薬理活性物質（サイクロスポリン、FK506、メバロン酸、ステロイドなど）、ビタミン、アミノ酸など多種多様な低分子化合物を生産する。これらは、生育に伴って生産される一次代謝産物と生育が終わった後で生産される二次代謝産物に大別される。一次代謝産物には、ビタミンやアミノ酸のように通常細胞の生育に必要な量だけごく少量生産されるものと、エタノールや乳酸のように最終代謝産物として、大量に生産されるものとに分類される。エタノール、アセトン、ブタノール、乳酸、グリセロールは発酵工業の伝統的産物である。これらは、糖の嫌氣的代謝の産物であり、酸素のない状態では NADH から NAD を再生するための最終電子受容体の産物である。エタノールは醸造工業の根幹たるもので、コモディティケミカルズとも言えよう。アセトンやブタノールなどの有機溶媒類は石油化学工業の副産物として戦後極めて安価になり、その発酵生産は終焉を迎えた。このように大量生産型微生物代謝産物の価格は常に政治、経済の状況によって大きな影響を受けてきた。例えば、石油価格の高騰により、エタノールの発酵生産が再び注目されている。過去10年前に比べ、工業用アルコールの発酵法による生産割合は10%から20%へと増加している。アセトン、ブタノール発酵も、安価な糖やデンプンなどを豊富に有する国においては再評価されてしかるべきである。

発酵法による世界のクエン酸生産は年間10万トンに達する。クエン酸は食品添加物、プラスチック可塑剤、界面活性剤、研磨剤など広い用途がある。グルコロン酸、2-ケトグルコロン酸、乳酸、イタコン酸、L-リンゴ酸なども発酵法により工業生産されている。化粧品の原料となるジヒドロキシアセトン酢酸菌を用いてグリセロールから発酵生産されている。L-グルタミン酸、L-リジン、メチオニンを中心とするアミノ酸の世界の年間生産量は70万トンに達し、とりわけ、L-グルタミン酸の発酵法により生産量は世界で年間34万トンに達し、その価格はコモディティケ

ミカルズ類と肩を並べるまでに来ている。よって食品添加物だけでなく、例えばポリグルタミン酸の出発原料など広い用途が期待されている。

3. 生体触媒を用いた化成品の生産

微生物の有する多様な機能のうち、単に生体触媒としての機能にのみ着目して微生物を直接触媒として利用する微生物利用技術は酵素法あるいは微生物変換法と呼ばれる。これは微生物を酵素、あるいは酵素の袋とみなして直接触媒的に用いる物質生産法である。即ち発酵法のようにエネルギー変換や複雑な生命現象が物質変換と共役する“生命”の存在は必須ではなく、酵素の基質特異性の許す限り非天然の人工基質から意図とした有用物質を生産することができる。酵素法はこのような特徴から、特に化学的方法で困難な有機化合物の合成変換、とりわけ光学活性なファインケミカルズ類合成の有力な手段として利用されてきた。しかし、生体触媒が極めて温和な反応条件、常温、常圧、水系の中性付近の pH で効率よく機能し、また化学的に不安定な化合物であっても副反応や分解反応を伴うことなく目的物が得られること、即ち化学合成プロセスが往々にして直面してきた省エネルギー、資源の保護、環境汚染の克服といった観点から汎用大量生産型化成品（コモディティケミカルズ）の生産に生体触媒を取り入れようとする試みが注目されている。しかし、ファインケミカルズとは対照的に大量生産型化成品はバルクで売買され、合成プロセスの中間体となる場合がほとんどであり、付加価値が低い。またその製品価格に占める原料価格の割合が高く、触媒を調製するコストの占める割合が大きいことを特徴とする。よって生体触媒を大量生産型化成品の生産工程に適用することは決して容易ではない。バイオプロセスが従来の化学合成プロセスを凌駕するにはそれこそかなりの生産効率（応液当たりの著量の生成物の蓄積と高い収率）を達成することや、極めて純度の高い製品が得られるなどの特徴が要求されよう。また生体触媒の繰り返し使用が可能でなければ経済的に従来法に太刀打ちできない。これらの問題点をクリアしてこそバイオプロセスが実現するのである。

生体触媒を石油化学化成品の合成に取り入れようとする初めての試みは、1979年プロピレンオキシド合成を目的としたシータスプロセスがある¹⁻³⁾。本ブ

の鉄イオンの添加が酵素生成に不可欠であることを明らかにした。さらに粘性物質の非生産菌を造成し、かつ親株に比べ酵素生産性の高い変異株を取得し、大幅な活性上昇に成功した¹⁴⁾。

先述のように、微生物を用いるアクリルアミドの生産は、日東化学グループの開発した *Rhodococcus* 細菌の固定化菌体を用いるバイオリクターによって、最初に実用化されたが、その後の比較検討の結果、アクリルアミドの蓄積能において、筆者らの調製した *P. chlororaphis* B23の変異株が有力であることが明らかになり、その後、日東化学グループとの協力のもとに、*P. chlororaphis* B23を用いる工業化研究を進め、1988年に本菌によるアクリルアミドの製造が開始されるに至った¹⁵⁾。*Rhodococcus* sp. N-774から *P. chlororaphis* B23へ菌株を代えることによってアクリルアミドの年間生産量は約50%増大す

ることになった (Table 1)。活性菌体はポリアクリルアミドによる包括法によって固定化され、ビーズ状にして反応系に添加される^{16,17)}。工業生産時の反応条件は、0-5℃、pH7.5-8.5、アクリロニトリルは1.5-2.0%に保たれ、その転化率は99.9%以上、アクリルアミド選択率は99.9%以上である。リアクター出口のアクリルアミド濃度は20%以上である。Fig. 2に還元銅触媒法と本法とのプロセスを比較した。本酵素法プロセスの特徴として、次のような点が上げられる。(1)ニトリルからアミドへの高転換率が得られ、未反応ニトリルの分離回収を必要としない。また銅イオンの分離回収のステップが省略される¹⁵⁾。この回収精製操作の簡略化は、重合性を有するモノマーの運転操作上、また品質上からも、好ましい。(2)水と反応は常圧下であり、高温高压や不活性雰囲気を要しない。装置構造設計の容易さと共に操作運転

Table 1 Comparison of three kinds of biocatalyst

	<i>Rhodococcus</i> sp. N-774	<i>Pseudomonas</i> <i>chlororaphis</i> B23	<i>Rhodococcus</i> <i>rhodochrous</i> J1
Tolerance to acrylamide (g/L)	27	40	50
Acrylic acid formation	very little	barely detected	barely detected
Cultivation time (h)	48	45	72
Activity of culture broth (units/ml)	900	1,400	2,100
Specific activity (units/mg cells)	60	85	76
Cell yield (g/L)	15	17	28
Acrylamide productivity (g/g cells)	500	850	>7,000
Total amount of production (ton/year)	4,000	6,000	30,000
Final concentration of acrylamide (g/L)	20	27	40
First year of production	1985	1988	1991

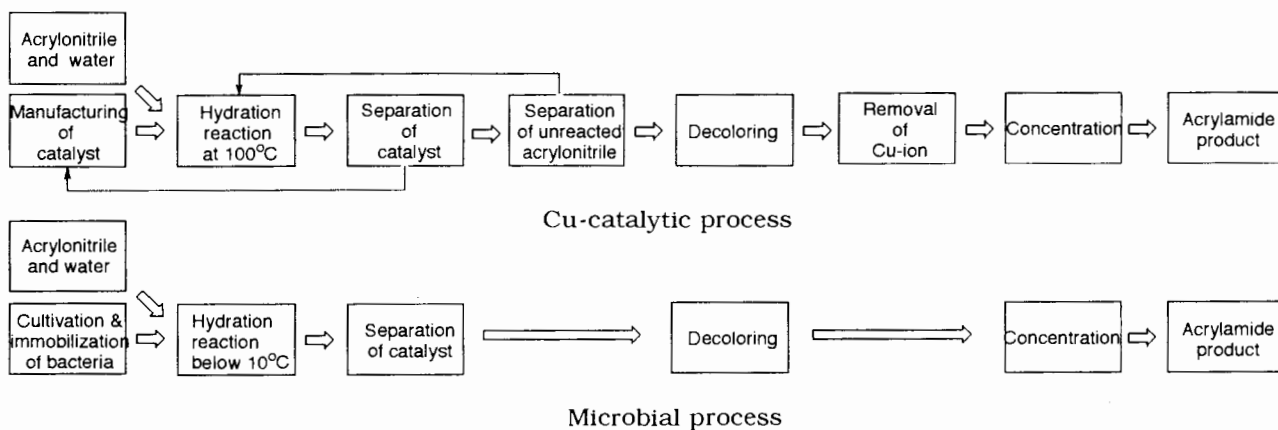


Fig. 2 Comparison of microbial and conventional processes for acrylamide.

Table 2 Comparison of three kinds of nitrile hydratases

	<i>Rhodococcus</i> sp. N-774	<i>Pseudomonas</i> <i>chlororaphis</i> B23	<i>Rhodococcus</i> <i>rhodochrous</i> J1
Molecular mass	70,000	100,000	505,000
Subunit molecular mass	α 27,000 β 27,500	α 25,000 β 25,000	α 26,000 β 29,000
Metal	Fe(III)	Fe(III)	Co
Optimum temperature (°C)	35	20	35-40
Heat stability (°C)	30	20	50
Optimum pH	7.7	7.5	6.5
pH stability	7.0-8.5	6.0-7.5	6.0-8.5
Substrate specificity	aliphatic nitriles	aliphatic nitriles	aliphatic & aromatic nitriles
Activation by light irradiation	+	-	-
Formation type	constitutive	inducible	inducible

の安全性が高い。(3)酵素反応の特異性からアミド選択性は極めて高く、副反応が少ない。これは高分子ポリマーを得るためのモノマー品質高位の要因である。(4)プロセス全系がコンパクトで軽装備であり、中小の生産規模にも適応性がある。

従来からの有機化学合成法に比べて、バイオプロセスはその触媒(微生物)を変えるだけで、収率や生産性の大幅な増加が達成される場合がある。筆者らはさらに微生物のニトリル代謝酵素の検討を進める過程で土壌分離菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 がコバルトイオンの添加によって、ニトリルヒドラーターゼを強烈に誘導生成する現象を見いだした¹⁸⁾。さらに本菌のアクリルアミドの生産性の向上を目指して、生体触媒の改良に努めたところ、J1 菌は B23 菌をはるかに凌ぐアクリルアミド生産能力を示した¹⁹⁾。従来のアクリルアミド生成菌である B23, *Rhodococcus* N-774, *Brevibacterium* R312 が三価の鉄イオンをコファクターとするのとは対照的に、J1 菌の酵素はコバルトイオンをコファクターとして含む²⁰⁻²⁴⁾。J1 菌をコバルトイオンをインデューサーとして尿素を含む栄養培地で培養した時、菌体の可溶性タンパク質の40%以上に達する著量のニトリルヒドラーターゼを生成するに至った¹⁹⁾。

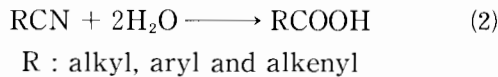
J1 菌のニトリルヒドラーターゼはこれまでの菌株に比べて熱安定性、溶媒耐性、基質濃度耐性、高濃度のアクリルアミド耐性を発揮した²⁵⁾。精製酵素で比較した場合、J1 酵素は50%アクリルアミド濃度下においてその触媒活性は影響を受けなかったが、G23 や R312 精製酵素の場合、20%アクリルアミドの存在下で既に阻害を受けて、もはや十分な触媒活性を発揮

できなかった。J1 菌の休止菌体を用いて、アクリルアミドの蓄積をベンチスケールで検討したところ、10°C, 15°C, 20°C で10時間反応により、100%の転換率でそれぞれ656, 567, 560 g/L の著量蓄積が認められた。1991年から、これまでの *P. chlororaphis* B23 に代わって、J1 菌が実際の工業生産に使われることになった。従って、アクリルアミドの工業生産はこれまで3種類の菌株が用いられてきたことになる。Table 1 にこれらの微生物によるアクリルアミド生産性を比較した。生体触媒(微生物)を交換するだけで、製造プラントになんの手を加えることなく著量の生産性の増加がみられる。このように優れた生体触媒(微生物)を選択することは極めて重要である。同じ反応を触媒する同じ属の微生物であっても、安定性、生成物阻害、反応効率、基質特異性などが大きく異なることがある(Table 2)^{25,26)}。1991年以来、J1 を用いたアクリルアミド生産が開始され、現在年間2万トンのスケールで稼動しており、その生産量はさらに増加しつつある。

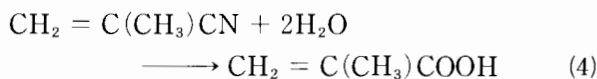
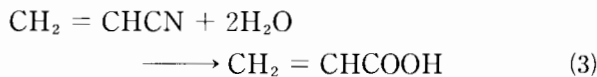
J1 株のニトリルヒドラーターゼは広い基質特異性を示す。3-シアノピリジン水和して、ニコチン酸アミドを生成し、反応液1L当たり、1.5kgの著量の蓄積が可能である^{27,28)}。この時、ニコチン酸を全く副生しないことから、このプロセスによるニコチン酸アミドの工業化も大いに期待される。(実際、1997年より世界一のニコチンアミド生産会社スイスのロンザ社により、本プロセスが工業化されることがごく最近決定された。) J1 酵素は安定であり、長期間活性菌体を保存することができることから、今後さらに種々のアミド類の生産に応用されることであろう。

3.2 アクリル酸, メタアクリル酸

ニトリル代謝のもう一つ重要な酵素にニトリルの酸とアンモニアへの加水分解を触媒するニトリラーゼがある (反応式(2)).



ニトリルの酸への加水分解は強酸性条件下での加熱を必要とするが, ニトリラーゼは, 極めて温和な条件下でニトリルの加水分解を触媒することからその用途は広い. 例えば, アミノニトリルやヒドロキシニトリル類のニトリラーゼによる光学特異的加水分解によって, 相当する光学活性アミノ酸, ヒドロキシ酸への変換は応用的意義がある. またアクリル酸, メタアクリル酸は種々のポリマー合成の重要な出発物質であり, それぞれプロピレン, イソブチレンのガス相酸化によって製造されている. これらの化学合成法の抱える深刻な問題点は触媒の劣化と生成物の重合である. 我々はアクリル酸やメタアクリル酸をそれぞれ相当するニトリルからニトリラーゼによって合成することを検討した (反応式(3), (4)).



筆者らは ϵ -カプロラクタムでニトリラーゼを微量に誘導させた菌体を用いて, ニトリルを経時的に添加

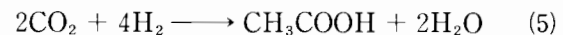
することにより, 100%の変換率で390 g/L, メタアクリル酸260 g/Lの蓄積を達成している^{29,30)}.

3.3 プロピレンオキシド

プロピレンオキシドはプロピレングライコールやポリプロピレングライコールの合成原料である. プロピレンのプロピレンオキシドへの直接酸化は実際的でないため, 従来の化学合成法は過酸化物の存在下でハロヒドリンにしてプロピレンオキシドに持っていく方法がとられている. バイオプロセスの試みとして, 上述のシータス法が知られているが, 最近メタン資化性菌のメタンモノオキシゲナーゼを C_2 - C_4 -1-アルケンに作用させて, それぞれに相当するエポキシドを得る試みがある (Fig. 3)³¹⁾. メタン資化性菌を含むバイオリアクターが構築され, この時コファクターとして必要な NADH はメタノールの酸化によって再生される. このリアクターの欠点は生体触媒の不安定さである. リアクターの簡素化, 生体触媒の再生, ダウンストリームの改良などさらなる検討が必要である.

3.4 酢酸

Clostridium aceticum が CO_2 と H_2 に生育し, 酢酸を生成することが以前から知られていたが, 1977年に新しい嫌気性細菌 *Acetobacterium* が炭酸ガスを還元し, 酢酸を生成することが見いだされた (反応式(5)).



スクリーニングによって得られた *Acetobacterium* BR

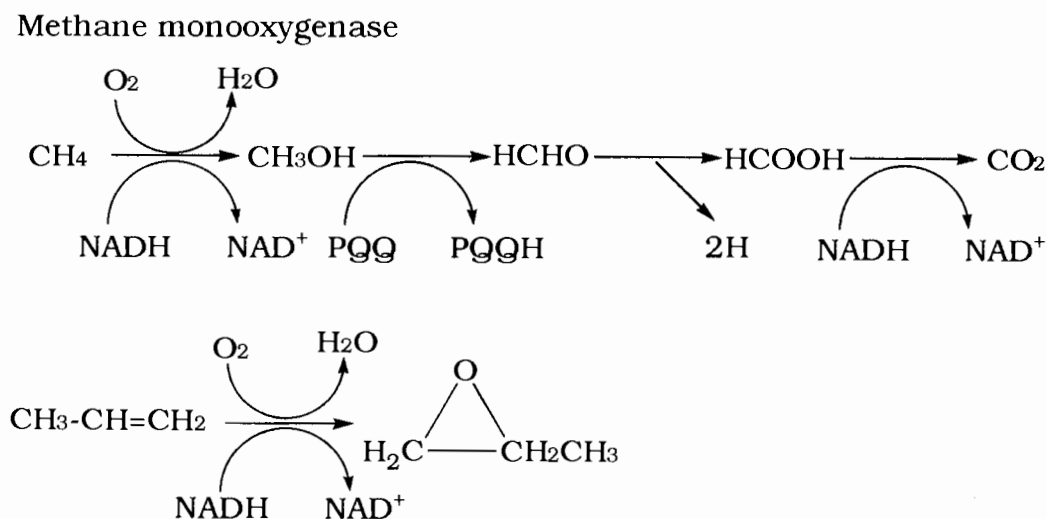


Fig. 3 Oxidation of methane and propene by methane monooxygenase.

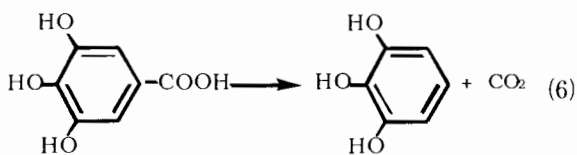
-46株は最適条件下で、30°Cで12日間、28日間の培養でそれぞれ41 g/L, 51 g/L の酢酸を生産蓄積することが報告されている³²⁾。

3.5 ハイドロキノン

ハイドロキノンは主に写真現像剤に用いられる。n-ブタン資化性菌である *Mycobacterium* sp. B-394 は、フェノールの位置特異的水酸化反応を触媒し、ハイドロキノンを生産する。メチルエチルケトンに単一炭素源として、窒素を制御した連続培養によって得られた活性菌体をリサイクルして用いるメンブレインバイオリアクターが構築された³³⁾。約120時間菌体を補充することなく連続運転することが可能であり、その生産能力は $3.0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、生成ハイドロキノン濃度は 2.2 g L^{-1} 、フェノールのハイドロキノンへの転換率は99%である。精製単離のダウンストリームのプロセスでは、逆浸透によって濃縮し、低温で結晶化が行われる。しかし、このような膜分離システムは菌の分離やハイドロキノンの単離に費用がかかり、実際の工業化を達成するには、さらなる検討が必要である。

3.6 ピロガロール

ピロガロールは、写真の現像剤、毛皮や皮革の染色、酸素吸収剤など広い用途がある。植物種子由来のタンニンから得られる没食子酸を強酸性条件下で加水分解することによってピロガロールが製造されている。*Citrobacter* 属細菌は誘導性の脱炭酸酵素を生成し、没食子酸からピロガロールを生成する(反応式(6))³⁴⁾。基質や生成物の酸素による酸化を抑制するための反応条件が検討され、至適条件で8時間反応、97.4%の収率で54.1 g/Lのピロガロールの蓄積が報告されている³⁵⁾。



3.7 インジゴ

インジゴは植物界にのみ存在し、衣類の青色染料として広く用いられている。バイエルによって示された化学合成法は複雑であり、過酷な反応条件で合成される。EnsleyらはFig. 4のように、*Pseudomonas* のナフタレンジオキシゲナーゼを大腸菌に発現させインジゴの合成を認めている³⁶⁾。ナフタレンジオキシ

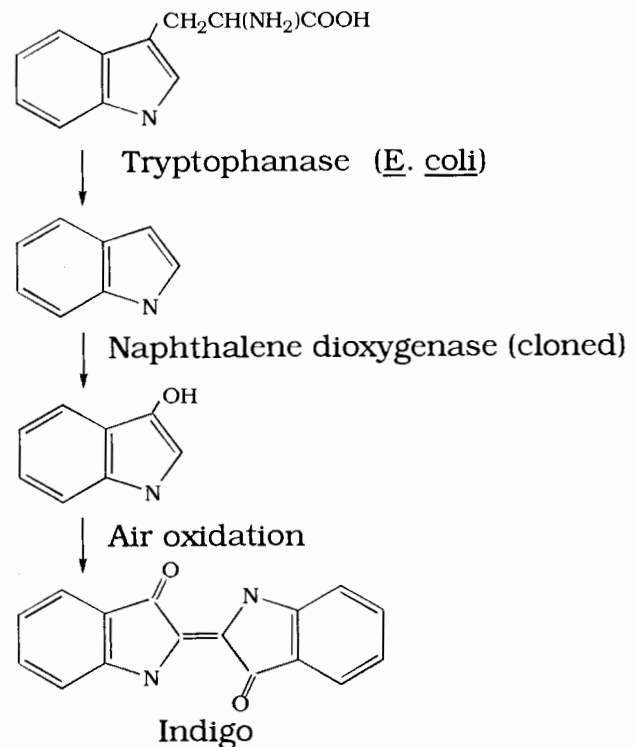


Fig. 4 Production of indigo by *E. coli* carrying a cloned naphthalene dioxygenase gene.

ゲナーゼはインドールの酸化を触媒し、インジゴを生成する。インドールは大腸菌トリプトファナーゼによってトリプトファンから合成される。

4. おわりに

多くの化学合成プロセスは省エネルギー、環境問題の観点において問題点を抱えている。しかし、たとえそれに代わるバイオプロセスがあり、環境保全に関してはるかに有利なプロセスであっても、現在のところ経済的理由から日の目をみないのが常である。しかし、一方で、環境保全のための種々の法的規制は年々厳しくなっており、環境保全のためのコスト高も無視できなくなるであろう。このような状況下で、アクリルアミドのような既存の大型化成品の生産プロセスにバイオプロセスが採用されるようになったのは、生体触媒の将来性を強く確信づけるものである。まだまだバイオの技術は case by case であり、アクリルアミドで成功したからといっても他のものでもうまくいく物ではない。しかし、それぞれの障壁を乗り越えるべく、肉薄した研究をおこなうことは重要である。これにより、共通した問題点が明白となる。またアクリルアミドはバイオプロ

セスによる大量生産型化成品生産の最初で最後の成功例ではないかとの悲観的な意見も聞かれる。しかし、換言すれば、J1菌のような脅威的な菌株が存在したことが、自然界には広く捜してみれば、それだけの能力を持った微生物が潜在していたという事実の重要性である。

微生物はいろいろな環境に適応できる多大な能力を持ち合わせている。新しい基質に作用しうる新規な酵素を誘導生成する能力を持っている。極限環境で生育あるいは生存しうる種々の微生物が最近になり分離されつつある。このような微生物は高温、高熱、強アルカリ、強酸に耐性を持つ特異な酵素を生成する。微生物の潜在能力はまだ十分に解明されていない。微生物は多種多彩であり、なにしろ現在の技術ではまだ全微生物の10%程度しか分離が可能ではないと言われている。今日では、遺伝子工学やタンパク工学、酵素精製や培養等の技術の発展に伴い、微生物のある特別の機能を増強させることが可能となった。将来、微生物を用いたコモディティケミカルズの生産は決して夢ではなく、ごくありふれたものとなることを期待している。

References

- 1) Neideleman, W. F., Jr. W. F. Amon and J. Geigert, U. S. Patent no. 4,247,641, Jan. 27 (1981)
- 2) Geigert, J., S. L. Neidleman, D. J. Daliesos and S. K. Dewitt: Enzymatic synthesis of α,β -halohydrins from Gaseous alkenes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 366-374 (1983)
- 3) Geigert, J., S. L. Neileman, T. E. Liu, S. K. Dewitt, B. M. Panschar, D. J. Dalietos and E. R. Siegel: Production of epoxides from α,β -halohydrins by *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1148-1149 (1983)
- 4) Commeyras, A., A. Arnaud, P. Galzy and J. L. Jallageas, U. S. Patent no. 4,000,081 (1977)
- 5) Jallageas, J. C., A. Arnaud and P. Galzy: Bioconversions of nitriles and their applications. *Adv. Biochem. Eng.*, **14**, 1-32 (1980)
- 6) Bui, K., A. Anaud and P. Galzy: A new method to prepare amides by bioconversion of corresponding nitriles. *Enzyme Microbial Technol.*, **4**, 195-197 (1982)
- 7) Watanabe, I., Y. Satoh and T. Kouno, Japanese Patent no. 129,190 (1970)
- 8) Watanabe, I. and M. Okumura, Japanese Patent no. 162,193 (1986)
- 9) Watanabe, I., Y. Satoh and K. Enomoto: Screening, isolation and taxonomical properties of microorganisms having acrylonitrile-hydrating activity. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3193-3199 (1987)
- 10) Asano, Y., Y. Tani and H. Yamada: A new enzyme "nitrile hydratase" which degrades acetonitrile in combination with amidase. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2251-2252 (1980)
- 11) Asano, Y., T. Yasuda, Y. Tani and H. Yamada: A new method of acrylamide production. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1183-1189 (1982)
- 12) Yamada, H., K. Ryuno, T. Nagasawa, K. Enomoto and I. Watanabe: Optimum culture conditions for production by *Pseudomonas chlororaphis* B23 on nitrile hydratase. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2859-2865 (1986)
- 13) Ryuno K., T. Nagasawa and H. Yamada: Isolation of advantageous mutants of *Pseudomonas chlororaphis* B23 for the enzymatic production of acrylamide. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1813-1816 (1988)
- 14) Nagasawa, T. and H. Yamada: *Pseudomonas chlororaphis* B23 nitrile hydratase as a catalyst for the enzymatic production of acrylamide. *Experientia*, **45**, 1066-1070 (1989)
- 15) Nagasawa, T. and H. Yamada: Microbial transformations of nitriles. *Trends in Biotechnol.*, **7**, 153-158 (1989)
- 16) Watanabe, I.: Acrylamide production method using immobilized nitrilase-containing microbial cells. *Methods in Enzymology*, **136**, 523-530 (1987)
- 17) Nakai, K., I. Watanabe, Y. Sato and K. Enomoto: Development of acrylamide manufacturing process using microorganisms. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **62**, 1443-1450 (1988)
- 18) Nagasawa, T., K. Takeuchi and H. Yamada: Occurrence of a cobalt-induced and cobalt-containing nitrile hydratase purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Biochem. Biophys. Commun.*, **155**, 1008-1016 (1988)
- 19) Nagasawa, T., K. Takeuchi, V. Nardi-Dei, Y. Mihara and H. Yamada: Optimum culture conditions for the production of cobalt-containing nitrile hydratase by *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 783-788 (1991)
- 20) Nagasawa, T., K. Takeuchi and H. Yamada: Characterization of a new cobalt-containing nitrile hydratase

- purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochromus* J1. Eur. J. of Biochem., **196**, 581-589 (1991)
- 21) Sugiura, Y., J. Kuwahara, T. Nagasawa and H. Yamada : Nitrile hydratase: The first non-heme iron enzyme with a typical low-spin Fe(III) active center. J. Am. Chem. Soc., **109**, 5848-5850 (1987)
- 22) Nagasawa, T., K. Ryuno and H. Yamada : Nitrile hydratase of *Brevibacterium* R312. Biochem. Biophys. Res. Commun., **139**, 1305-1312 (1986)
- 23) Nagasawa, T., H. Nanba, K. Ryuno, K. Takeuchi and H. Yamada : Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23: Purification and characterization. Eur. J. Biochem., **162**, 691-698 (1987)
- 24) Endo, T. and I. Watanabe : Nitrile hydratase of *Rhodococcus* sp. N-774. FEBS Letters **243**, 61-64 (1989)
- 25) Nagasawa, T., H. Shimizu and H. Yamada : The superiority of the third generation catalyst, *Rhodococcus rhodochromus* J1 nitrile hydratase, for the industrial production of acrylamide. Appl. Microbiol. Biotechnol., **40**, 189-195 (1993)
- 26) Kobayashi, M., T. Nagasawa and H. Yamada : Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over. Trends in Biotechnology **10**, 402-208 (1992)
- 27) Nagasawa, T., C. D. Mathew, J. Mauger and H. Yamada : Nitrile hydratase-catalyzed production of nicotinamide from 3-cyanopyridine in *Rhodococcus rhodochromus* J1. Appl. Environ. Biotechnol. **54**, 1766-1769 (1988)
- 28) Nagasawa, T. and H. Yamada : Large-scale bioconversion of nitriles into useful amides and acids. Biocatalysis, ed. By Abramowicz, D. A. Van Nostrand Reinhold, New York, pp.277-318, 1990.
- 29) Nagasawa, T., T. Nakamura and H. Yamada : ϵ -Caprolactam, a new inducer for the formation of *Rhodococcus rhodochromus* J1 nitrilase. Arch. Microbiol., **155**, 13-17 (1990)
- 30) Nagasawa, T., T. Nakamura and H. Yamada : Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochromus* J1 nitrilase. Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 322-324 (1990)
- 31) Suzuki, G. : Microbial conversion of alkene. Bioscience & Industry, **49**, 492-497 (1991)
- 32) 森永 豪 : 嫌気性菌による二酸化炭素から酢酸の合成, 発酵と工業, **43**, 1015-1023 (1985)
- 33) Yoshida, S., A. Yoshikawa and I. Terao : Microbial production of hydroquinone. J. Bacteriol., **14**, 195-202 (1990)
- 34) Yoshida, H., Y. Tani and H. Yamada : Isolation and identification of a pyrogallol producing bacterium from soil. Agric. Biol. Chem., **46**, 2539-2546 (1982)
- 35) Yoshida, H. and H. Yamada : Microbial production of pyrogallol through decarboxylation of gallic acid. Agric. Biol. Chem., **49**, 659-663 (1985)
- 36) Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett and D. T. Gibson : Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. Science, **222**, 167-169 (1983)