

中温性糸状菌の生産する耐熱性 -グルコシダーゼ

誌名	日本大学農獣医学部学術研究報告
ISSN	00780839
著者名	加藤,順 高田,直樹 岡野,亨
発行元	日本大学農獣医学会
巻/号	50号
掲載ページ	p. 26-33
発行年月	1993年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Thermostable β -Glucosidase Produced by a Mesophilic Fungus

Jun KATO, Naoki TAKADA, Tohru OKANO and Kunio OISHI

Lab. Microbiological Chemistry, Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., 34-1, Shimouma 3 chome, Setagaya-ku, Tokyo 154

(Accepted Oct. 22, 1992)

Abstract: β -Glucosidase [β -glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21], produced by mesophilic fungus strain AK10A3 isolated from soil, was purified and its characteristics were studied.

Strain AK10A3, that was able to grow at 25-35°C but not at 45°C on MYP agar plate, produced thermostable β -glucosidase in cell. The enzyme was purified 2000 fold to homogeneity from cell free extracts of AK10A3 by ammonium sulphate precipitation, thermal denaturation of inert protein, hydrophobic chromatography with Butyl-Toyopeal 650M and fast protein liquid chromatography with Superose 12HR column.

The molecular mass of the native enzyme was estimated to be 360kDa from FPLC gel filtration and that of this enzyme subunits 140kDa and 95kDa from SDS-PAGE.

The purified enzyme had a pH optimum of 5.0 and an optimum temperature at 70°C. The β -glucosidase was thermostable with a half life of 5 min at 70°C and no loss in activity at 60°C. In the presence of ammonium sulphate, full activity of the enzyme was remained after incubation at 70°C for 1hr. Additional effects of ammonium sulphate on the thermostability of β -glucosidase from mesophilic fungus were discussed.

Key words: Thermostable enzyme, Mesophilic fungus, β -glucosidase

中温性糸状菌の生産する耐熱性 β -グルコシダーゼ

加藤 順・高田 直樹・岡野 亨・大石 邦夫

日本大学農獣医学部 微生物化学研究室

(1992年10月22日受理)

β -Glucosidase (β -Glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) は、セルロースをグルコースに分解する酵素群として重要な酵素であるばかりでなく、工業的な利用度も高く、その機能について各方面からの研究がなされている¹⁻⁴⁾。また近年、酵素の効率的な利用を目的として固定化酵素の応用が注目されている⁵⁻⁹⁾。従って、酵素の機能として、速い反応性、pH 安定性、熱に対する安定性などが要求されることから、酵素の生産資源として、耐熱性、好熱性微生物を対象に研究されている⁹⁻¹⁰⁾。

しかし、我々は微生物の機能の多様性に注目し、特に、常温で生育する微生物が生産する酵素に対する熱の影響

について検討している¹¹⁻¹³⁾。

今回、土壌より分離した一菌株に強い β -グルコシダーゼ活性を見いだした。本菌株より β -グルコシダーゼを精製すると同時に、本酵素の諸性質について検討したので報告する。

実験材料および方法

試薬

バクト麦芽エキス、バクト酵母エキス (Difco) は三光純薬 (東京)、p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドはナカライテクス (東京)、Superose 12 HR 10/30 カラム、Gelfiltration calibration kit, Electro-

phoresis calibration kit は Pharmasia (Uppsala, Sweden), Centricon-10 はアミコン (株) より入手した。そのほかの試薬はすべて特級を用い、和光純薬 (東京) より購入した。

方法

耐熱性 β -グルコシダーゼ生産菌の単離

千葉県、栃木県より採集した土壌を分離源として 0.3% 麦芽エキス, 0.5% ペプトン, 0.3% 酵母エキス, 1% グルコース, 0.1mg/ml カナマイシンを含む MYP 寒天培地で, 265 株を分離した。単離菌株を, MYP 液体培地で, 30°C, 4 日間振とう培養した。培養物を, 70°C, 10 分加熱処理後, β -グルコシダーゼ活性の有無を調べた。

β -グルコシダーゼ活性測定

以下に記す反応系を用いた。10mM p-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド 100 μ l, 50mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.5 100 μ l, 試料 50 μ l, 蒸留水を加え, 500 μ l とした。反応混液を各実験条件における温度, 時間でインキュベートした後, 1M 炭酸ナトリウム溶液 500 μ l を添加し, 反応を停止した。遊離した p-ニトロフェノール量を分光光度計により 420nm で測定した。

活性は 1 分間当たりの吸光度の増加として表し, 0.1/min を 1 単位 (U) とした。

分子量の決定

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemuli の方法に従い¹⁴⁾, 1% SDS, 7.5% ポリアクリルアミドゲル (8×5×0.1cm) を用いた。タンパクバンドは銀染色法により検出した¹⁵⁾。マーカータンパクは Electrophoresis calibration kit を用いた。

ゲル濾過クロマトグラフィー

β -グルコシダーゼの分子量は Superose 12 HR 10/30 をカラムとする Fast protein liquid chromatography (FPLC) により調べた。マーカータンパクは Gel filtration calibration kit を用いた。

タンパク量の決定

分光光度計により, 波長 280nm における吸収を調べ, 牛血清アルブミン相当量で表した。

結果および考察

耐熱性 β -グルコシダーゼ生産菌

土壌より分離した 265 菌株を MYP 液体培地に接種, 30°C, 4 日間振とう培養後, 70°C, 10 分間加熱し, β -グルコシダーゼ活性を調べた結果, 4 菌株に酵素活性が認められ, 特に強い活性を示した AK 10A 3 株を選択した。



Fig. 1 Phase-contrast photomicrograph of strain AK 10A 3

本菌株は MYP 寒天平板培地で 25°C から 35°C で良く生育したが, 45°C では全く生育せず, 典型的な中温菌であった。Fig. 1 に顕微鏡写真を示した。コロニー, 菌糸, 胞子の形態から, *Penicillium* 属と推定された。

AK10A 3 株からの β -グルコシダーゼの抽出

AK10A3 株の耐熱性 β -グルコシダーゼを精製するため, β -グルコシダーゼの局在と抽出方法について検討した結果を Table 1 に示した。

AK10A3 株を MYP 培地で 30°C, 3 日間, 振とう培養後, 遠心により上清と菌体に分離した。菌体は上清と同量の 50mM トリス-塩酸緩衝液に懸濁し, 活性を調べた。菌体懸濁液では, 上清に比べ約 5 倍の p-ニトロフェノールを遊離することから β -グルコシダーゼは菌体内に局在しており, 菌体外に β -グルコシダーゼを生産する *Penicillium funiculosum*¹⁶⁾ と異なる性質を示した。

そこで, 菌体の破碎法について検討した。

1) 加熱による方法; 菌体懸濁液 (湿菌体 1g/10ml 50mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.5) を 70°C, 10 分加熱後, 遠心により抽出液と破碎菌体に分離した。破碎菌体は再び 50mM トリス-塩酸緩衝液を加え 10ml の懸濁液とした。2) ビブロゲン-セルミル (エムエス機器) による方法; 湿菌体 1g に 3g のガラスビーズ (0.5mm), 9ml の 50mM トリス-塩酸緩衝液を加え, 2 分間の振とうを 5 回, 0°C 冷却下に行い, 破碎物を得た後, 1) と同様の手順で, 抽出液と破碎菌体懸濁液を調製した。3) 乳鉢による破碎; 湿菌体 1g を氷冷しつつ乳鉢により, ペースト状になるまで磨砕し, 50mM トリス-塩酸緩衝液

Table 1 Extraction of β -glucosidase from AK 10A 3

		activity* U/ml	protein mg/ml	specific activity U/mg protein
Culture Sup		0.10	0.75	0.13
Cells**		0.49	—	—
Heated cells (70°C 10min)	Sup	0.18	4.11	0.04
	Cell debris***	0.76	—	—
Homogenized cells (Cell mill)	Sup	0.27	1.79	0.15
	Cell debris	0.46	—	—
Heomogenized cells (Motar)	Sup	0.94	5.59	0.17
	Cell debris	0.57	—	—

*: 0.10 OD/min at 420nm

**: Cell was resuspended in 50mM Tris-HCl buffer pH 7.5

***: Cell debris was resuspended in 50mM Tris-HCl buffer pH 7.5

9 ml を加え、十分攪はん後、1) と同様に試料を調製した。

粗抽出液 (Sup) と菌体懸濁液 (cell debris) について、反応温度 70°C で活性を調べた。抽出液についてはタンパク量も調べた。

加熱処理しただけの菌体には 80% の活性が保持されていたが、粗抽出液に多量のタンパクが認められることから、加熱により菌体そのものは、破壊されているが、 β -グルコシダーゼは何らかの相互作用により菌体に強く結合しており、酵素が固定化されたいわゆる処理菌体としての応用が可能と思われた。また、セルミルでは粗抽出液の活性、タンパク量ともに低く、この方法では菌体が破壊されない。乳鉢破碎による粗抽出液の活性、タンパク量の値はともに、他の方法よりも高い。比活性を比

較した結果、菌体の破碎法として、乳鉢による方法が最も効率のよい方法であった。しかし、約 30% の酵素活性は依然として破碎菌体に結合していた。*P. funiculosum* の β -グルコシダーゼが菌糸に強く結合することと類似する結果とも考えられる¹⁶⁾。

疎水クロマトグラフィーによる β -グルコシダーゼの分離

本菌株の生産する β -グルコシダーゼが菌体膜に強く結合していると推定される結果から、膜に結合しているタンパクや ATPase の精製に用いられている、疎水クロマトグラフィー、ブチルルートヨパール 650M の応用¹⁷⁻¹⁸⁾を検討し、その結果を Fig. 2(A), (B), (C) に示した。

乳鉢破碎により得た粗抽出液に 45% 飽和量 (277g/l)

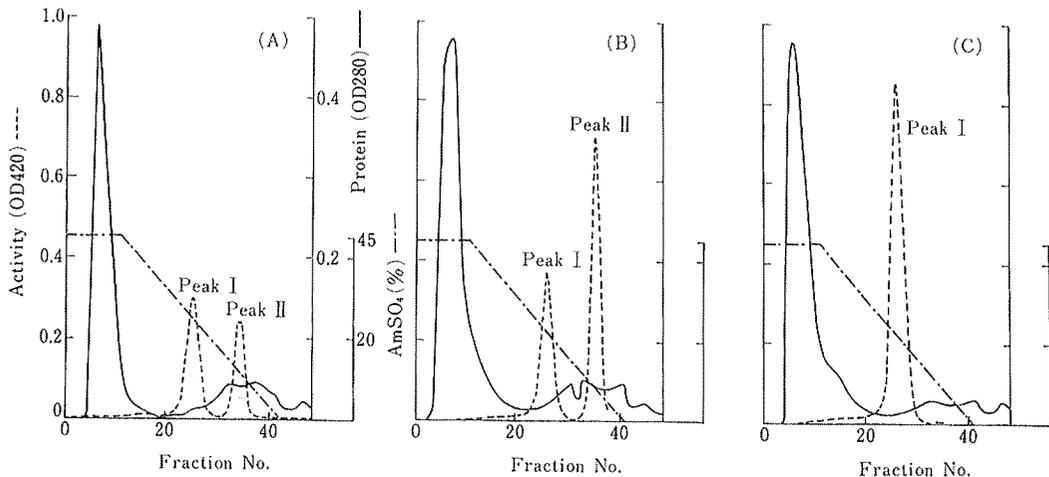


Fig. 2 Chromatography of supernatants fractionated by ammonium sulphate from crude extract on Butyl-Toyopearl 650M column. Samples were incubated for 0min (A), 10min (B) and 60min (C) at 70°C and applied to the columns.

Line: —, absorbance at 280nm; - - - , β -glucosidase activity; - · - · , ammonium sulphate concentration.

の硫酸を添加し、遠心により沈殿を除去し、 β -グルコシダーゼを上清に回収した。この上清を、未加熱、70°C、10分、さらに60分加熱した3種の試料を調製した。45%飽和硫酸/50mM トリス-塩酸緩衝液で平衡化してあるブチルトヨパール 650M カラムに試料を添加した。カラムの3倍容の平衡化溶液で非吸着画分を除去したのち、45%飽和硫酸/50mM トリス-塩酸緩衝液 -50mM トリス-塩酸緩衝液による直線濃度勾配により溶出、分画した。未加熱 (A)、70°C、10分処理 (B)、70°C、60分処理 (C)、それぞれの溶出パターンを比較した。

未加熱試料から、22-20% 飽和硫酸濃度で溶出される画分 (ピーク I) と 12-10% で溶出される画分 (ピーク II) に β -グルコシダーゼ活性が認められた。70°C、10分加熱試料も β -グルコシダーゼ活性は全く同じ位置に活性ピーク I、ピーク II が溶出された。しかし、ピーク II 画分は未加熱のピーク II 画分に比べ活性が強いことから、結合または共存する、活性を阻害する物質との分離が示唆された。さらに、60分加熱した試料では、主として、ピーク I 画分のみであったが、ピーク II に相当する画分に弱い β -グルコシダーゼ活性が認められた。

この結果から、疎水性の大きく異なる2種の β -グルコシダーゼの存在が確認されたが、加熱処理により、ピーク II の β -グルコシダーゼは疎水性の弱いピークへと疎水性が変化することから、ピーク II の β -グルコシダーゼが、疎水性物質と結合していることが推察される。また、この結果は、Table 1 に示したように本酵素の細胞膜への強い結合を示唆している。従って、ピーク I 酵素をある条件下で疎水性担体へ人為的に再結合し、固定化することも可能と思われる。

Superose 12HR 10/30 カラムによるピーク I、ピーク II β -グルコシダーゼの単離

疎水性を異にするピーク I、ピーク II それぞれの β -グルコシダーゼを単離する目的で Superose 12HR 10/30 カラムを用いた FPLC によりゲル濾過を行った。

ピーク I、ピーク II 画分 (Fig. 2 (B)) をそれぞれ、セントリコン-10 で50倍に濃縮後、溶出緩衝液である 0.15M NaCl/50mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 に平衡化した。溶出条件は流速 0.4ml/min、分画量は 0.4ml/tube とした。タンパクの溶出は 280nm の吸収、 β -グルコシダーゼの溶出は各画分の活性を測定し Fig. 3 (A), (B) に示した。 β -グルコシダーゼはピーク I、ピーク II とともに25分に溶出される画分にシャープなピークを示すことから、疎水性は大きく異なっているものの、酵素タンパクの分子量は全く同一であると推定した。また、ピーク I では溶出される活性ピークのパターンとタンパクのパターンが一致し、この精製段階で β -グル

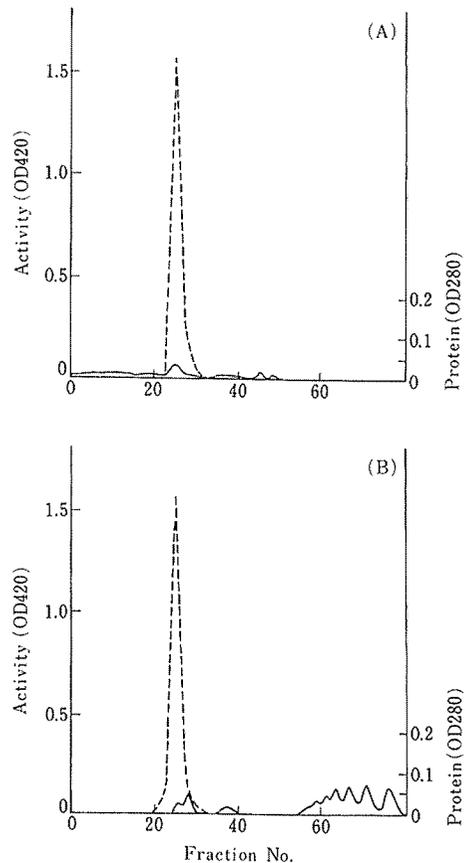


Fig. 3 Chromatography of peak I and II β -glucosidase from Butyl-Toyopearl 650M column on Superose 12 HR 10/30 column. Elution profiles of peak I and II were shown on panel A and B respectively.

Line: ---, β -glucosidase activity; —, absorbance at 280 nm.

コシダーゼはほぼ単一化されていた。一方、ピーク II のタンパクは55分以後に規則的な溶出がみられた。しかし、この位置へのタンパクの溶出は、Superose 12 HR 10/30 のゲル濾過による分画可能な範囲より極端に小さな分子量であり、また、ゲル自体が疎水性物質に対して結合性を持つことなどから、このように遅れて溶出されるタンパクはゲル担体への疎水的相互作用が推察され、未加熱粗酵素液中ではこれらタンパクが β -グルコシダーゼに結合し、ピーク II 画分の疎水性を付加していることが示唆される。また、*P. funiculosum* において報告されている β -グルコシダーゼの菌体膜への結合と放出

Table 2 Purification of thermostable β -glucosidase from AK 10A 3

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Purification (-fold)	Yield (%)
Crude extract	274.9	2618.0	0.11	1	100
45% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sup	167.0	693.6	0.24	2	60.7
Butyl-Toyopearl 650	152.0	1.4	108.57	987	55.3
2nd. Superose 12HR	29.7	0.13	228.46	2077	10.8

U: 0.1 OD/min at 420nm

に関連した機構に係わるタンパクとも考えられる¹⁷⁾。

耐熱性 β -グルコシダーゼの精製

前記の実験結果を基に、菌体の粗抽出液の硫酸分画、加熱処理、ブチルトヨパール 650M による疎水クロマトグラフィー、Superose HR 12 prep カラムクロマト、Superose 12 HR 10/30 カラムクロマトグラフィーにより、AK 10A 3 株湿菌体 10g から最終的に比活性で約 2,000 倍に精製された酵素標品、0.13mg を得た。各精製段階における、活性、タンパク量、比活性、回収率を Table 2 に示した。この耐熱性 β -グルコシダーゼ標品は、Superose 12 HR 10/30 による活性ピークとタンパクピークのパターンが一致すること、非還元条件下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドであることから、純化されていることが確認された。

耐熱性 β -グルコシダーゼの分子量

Fig. 4 に示すように、活性を持った状態の分子量を Superose 12 HR 10/30 カラムのゲル濾過により測定し、標準タンパクの溶出時間と比較し、360kDa と算定した。この分子量は *A. fumigatus* が生産する菌体外 β -グルコシダーゼ (380kDa) に近い。この酵素は 95kDa のサブユニット 4 個から成る 4 量体である¹⁹⁾。また、SDS-PAGE による結果を Fig. 5 に示す。還元条件下では、140kDa (A)、と 96kDa (B) の 2 本のバンドが認められ、耐熱性 β -グルコシダーゼが、*A. fumigatus* と同様にサブユニット構造を持つと仮定すると、A \times 2 (280kDa)、B \times 1 (96kDa) で構成される 3 量体と推定された。

精製標品と破碎菌体結合 β -グルコシダーゼの反応温度および pH の影響

各温度における酵素反応の速度を精製標品と一種の固定化 β -グルコシダーゼと考えられる菌体破碎物懸濁液について測定し、相対活性として Fig. 6 に示した。

至適反応温度は共に 70°C で *A. niger* とほぼ同程度であった²⁾。しかし、本菌株の生育限度内の温度 (35°C) では 10% 以下の活性しか示さず、本菌株の生育に対する β -グルコシダーゼの生理的役割に興味もたれた。

一方、80°C では精製標品の反応速度は 25% まで低下

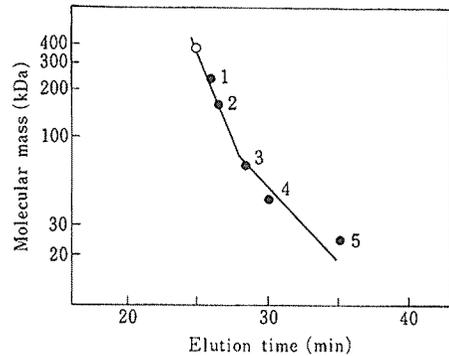


Fig. 4 Estimation of molecular mass of thermostable β -glucosidase by FPLC with Superose 12 HR 10/30 column.

1, catarase (232000); 2, aldolase (158000); 3, BSA (67000); 4, ovalbumin (43000); 5, chymotrypsinogen A (25000); \circ , Thermostable β -glucosidase from AK 10A 3.

するが、菌体結合酵素は 50% の活性を示した。酵素反応速度は温度の上昇にともない増加するが、それとともに酵素の失活も生ずる、従って 80°C で破碎菌体の活性が高いのは基質の分解速度が上昇したのではなく菌体への結合による、耐熱性の上昇によるものと考えられる。

酵素反応における pH と緩衝液組成の影響を精製標品、破碎菌体結合酵素について検討した。標準的反応液組成の緩衝液を変えて、70°C で反応させ、相対活性で Fig. 7 に示した。

両試料とも、pH 5.0 で反応速度が最大となり、pH 4.0, pH 6.0 でも 50% の反応速度であった。また pH 活性曲線が類似することから、耐熱性 β -グルコシダーゼと菌体 β -グルコシダーゼは同一酵素であると考えられる。

β -グルコシダーゼの耐熱性と硫酸添加の影響

破碎菌体懸濁液、精製 β -グルコシダーゼ溶液、硫酸添加 (0.22g/ml) した精製 β -グルコシダーゼ溶液を 40°C–100°C の各温度で、10 分間加熱処理した試料の残存活性を Fig. 8 (A) に示した。60°C ではどの試料も

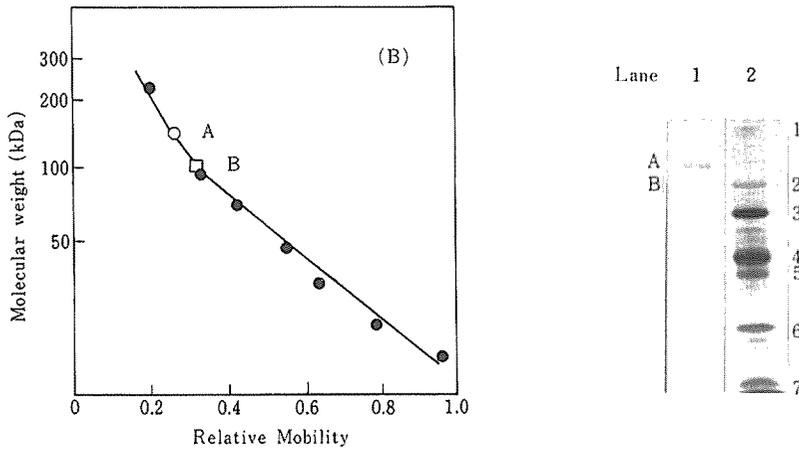


Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (panel A) and estimation of molecular weight (panel B) of thermostable β -glucosidase.

Lane 1, purified thermostable β -glucosidase; lane 2, molecular weight standard: 1, catalse (232000); 2, phosphorylase b; 3, BSA (67000); 4, ovalbumin (43000); 5, carbonic anhydrase (30000); 6, soybean trypsin inhibitor (20100); 7, lactalbumin (14400); A, (140000); B, (96000): subunit of β -glucosidase from AK 10A 3.

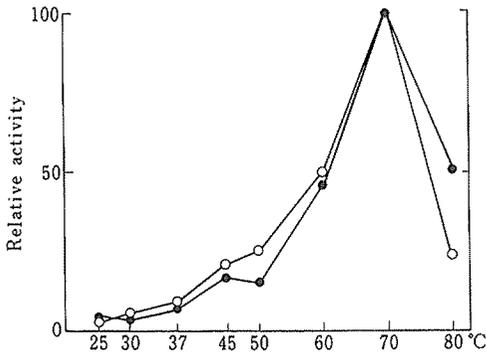


Fig. 6 Effect of temperature on the activity of purified and cell debris bound β -glucosidases

The enzyme activities were assayed at various temperatures in 50mM acetate buffer (pH 5.0). Symbol: \circ , purified β -glucosidase; \bullet , cell debris bound β -glucosidase.

100%の活性を維持していた。70°Cでは精製標品は急激に失活するが、破碎菌体結合 β -グルコシダーゼは60%の活性を保持していた。この結果は、セロビアーゼがデキストランや、アミロースと複合体を形成すると、耐熱性が上昇する²¹⁾、あるいは、カナマイシンヌクレオチド転移酵素が臭化シアンでSephadexに固定化されると耐熱性が上昇すること²³⁾と同様、菌体と結合していることにより酵素の高次構造が安定化されていることを示唆する。

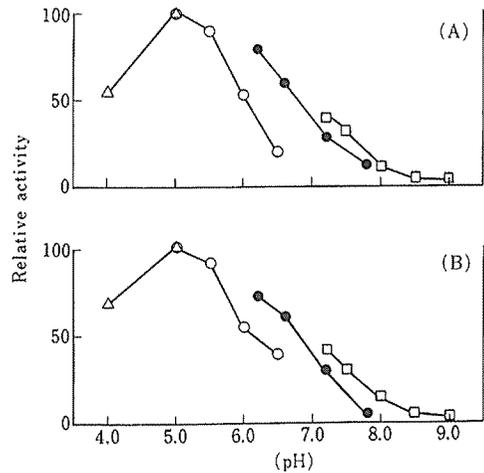


Fig. 7 Effect of pH on the activity of purified β -glucosidase (A) and cell debris bound β -glucosidase (B).

The enzyme activity was assayed at various pH (pH 4.0-9.0) at 70°C for 10min.

Symbol: Δ , acetic acid-sodium acetate; \circ , cacodylate-hydrochloride; \square , Tris-hydrachloride.

硫安の添加により加熱による失活は阻止されるが、セロビアーゼの凍結による失活を阻止し²³⁾、酵素の安定化のために添加されるグリセロール、アルブミンでは失活抑制効果は認められなかった。

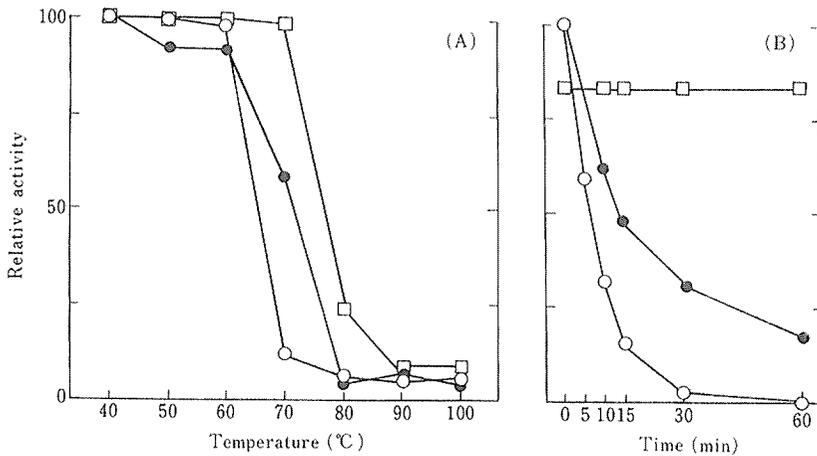


Fig. 8 Effect of temperature on the stability at purified, cell debris bound β -glucosidase and β -glucosidase in the presence of ammonium sulphate. Enzyme preparations were subjected to heat at various temperatures for 10 min. (A) and at 70°C for various period (B).

Symbol: O, purified β -glucosidase; ●, cell debris bound β -glucosidase; □, purified β -glucosidase/45% ammonium sulphate solution.

酵素標品の耐熱性への硫酸の影響を70°Cにおける各時間毎の残存活性を調べFig. 8(B)に示した。精製標品は30分ではほぼ失活するが、破砕菌体結合酵素は、30%の活性が残存しており、1時間、加熱しても15%の活性が保持されていた。硫酸添加した精製標品は20%程度活性が阻害されるものの60分の加熱によっても全く失活せず、硫酸が本酵素の耐熱性の上昇に深く関わっていることはこれまでの結果から明らかであるが、その機構については不明である。

一般に、好熱菌から単離した β -グルコシダーゼでも60°C程度の加熱に対して安定であるが、70°C近くの温度では急激に失活する²⁴⁾。

従って、今回報告したように、土壌から分離した中温菌の β -グルコシダーゼが硫酸存在下で10°C近く耐熱性が上昇する要因を明らかにすることは、固定化が酵素の耐熱性を上昇させる機構の解明と同様、酵素タンパクの構造と耐熱性の関係を知る上で重要である。

要 約

土壌より分離したAK 10A 3株は、45°Cでは生育しない典型的な中温菌であったが、耐熱性 β -グルコシダーゼを生産し、しかも菌体内酵素であった。加熱しても菌体から遊離することなく、活性を保持することから、いわゆる固定化酵素のような処理菌体となった。乳鉢により磨砕した菌体の抽出液から、硫酸分画、加熱処理、疎水クロマトグラフィー、Superose 12 HR カラムを用

いたFPLCにより、10gの湿菌体から比活性228U/mg protein、精製率で2,000倍の酵素標品0.13mgを精製した。

本酵素の分子量はゲル濾過で360kDa、SDS-PAGEで分子量140kDaと96kDaのサブユニットへの解離が認められた。本酵素の反応至適pHは5.0であった。反応至適温度は70°Cで、生育限界温度との差が大きく、本酵素の生理的意義に興味を持たれた。温度に対する安定性は60°C、10分で安定であるが、70°Cでは失活した。しかし菌体に結合した酵素は70°C、10分の加熱でも、60%の活性が残存していることから、菌体への結合、ある意味での固定化が耐熱性の一要因と推定された。さらに70°C、30分の加熱で精製酵素標品は完全に活性を失うが、硫酸存在下では、70°C、1時間処理によっても、全く失活が認められない。この現象は、熱に不安定な酵素でもなんらかの構造変化をさせることにより、耐熱性が付与される可能性を示唆するものであり、その機構を知る糸口になると思われる。

文 献

- 1 Methods in Enzymology, volume 160 "Biomass" Part A. WOOD, W. A and KELLOGG, T. S., p. 87-500, 1988 Academic press, Inc. (San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto).
- 2 GUNATA, Y. Z., BAYONOVE, L. C., TAPIERO, C. and CORDONNIER, E. R., 1990: Hydrolysis

- of grape monoterpenyl β -d-glucosides by various β -glucosides., *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1232-1236.
- 3 OHTA, T., OMORI, T., SHIMOJO, H., HASHIMOTO, K., SAMUTA, T. and OHBA, T., 1991: Identification of monoterpene alcohol β -glucosides in sweet potatoes and purification of a *Shiro-koji* β -glucosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1811-1816.
 - 4 OHTA, T., IKUTA, R., NAKASHIMA, M., MORIMITSU, Y., SAMUTA, T. and SAIKI, H., 1990: Characteristic flavor of *Kansho-shochu* (Sweet potato spirit). *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1353-1357.
 - 5 田中渥夫, 1990: 固定化生体触媒「バイオリクター 福井三郎編」(講談社, 東京) pp. 1-72.
 - 6 MARTINEK, K., KLIBANOV, M.A., GOLDMACHER, S.V. and BEREZIN, V.I., 1977: The principles of enzyme stabilization, I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of polymer support in a multipoint fashion. *Biochim. Biophys. Acta.*, **485**, 1-12.
 - 7 MARTINEK, K., KLIBANOV, M.A., GOLDMACHER, S.V., TCHENYSHEVA, V.A., MOZHAEV, V.V., BEREZIN, V.I. and GLOTOV, O.B., 1977: The principles of enzyme stabilization. II. Increase in the thermostability of enzymes as a result of multipoint noncovalent interaction with a polymeric support. *Biochim. Biophys. Acta.* **485**, 13-28.
 - 8 ZAMOST, B.L., NIELSEN, H.K. and STARNES, R.L., 1991: Thermostable enzyme for industrial applications. *J. Ind. Micro. Biol.*, **8**, 71-82.
 - 9 ROY, K.S., RAHA, K.S., SADHUKHAN, K.R. and CHAKRABARTY, L.S., 1991: Purification and characterization of extracellular glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. *World J. microbiol. Biotechnol.* **7**, 613-618.
 - 10 CONSTANTINO, R.H., BROWN, H.S. and KELLY, M.R., 1990: Purification and characterization of an α -glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115°C. *J. Bacteriol.*, **172**, 3654-3660.
 - 11 岡野 亨, 安田季栄, 加藤 順, 大石邦夫, 1991: *Aspergillus sojae* の熱活性化 DNase, 日本農芸化学会 1991年度大会講演要旨集, 348.
 - 12 加藤 順, 鴨下修吾, 岡野 亨, 大石邦夫, 1991: 土壌糸状菌 104 B 3 株の生産する γ -グルタミルトランスアミナーゼ, 平成 4 年度, 日本醸造工学会大会, 講演要旨集, 210.
 - 13 加藤 順, 甲斐田竜司, 岡野 亨, 大石邦夫, 1992: 土壌糸状菌の生産する耐熱 α -ガラクトシダーゼ, 日本農芸化学会, 1992年度大会講演要旨集, 533.
 - 14 LAEMMLI, U.K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
 - 15 OAKLEY, B.R., KIRSCH, D.R., and MORRIS, N.R., 1980: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **105**, 361-363.
 - 16 KANTHAM, L., and JAGANNATHAN, V., 1985: β -glucosidase of *Penicillium funiculosum*. II. Properties and mycelial binding. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, pp. 786-791.
 - 17 MATSUSHITA, T., UEDA, T. and KUSAKA, I., 1986: Purification and characterization of $\text{Ca}^{++}/\text{H}^{+}$ antiporter from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.*, **156**, 95-100.
 - 18 KONISHI, J., WAKAGI, T., OSHIMA, T. and YASHIDA, M., 1987: Purification and properties of the ATPase solubilized from membranes of Acidothermophilic archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biochem.*, **102**, 1379-1387.
 - 19 KITPREECHAVANICH, V., HAYASHI, M. and NAGAI, S., 1986: Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Agric Biol. Chem.*, **50**, 1703-1711.
 - 20 DEKKER, H.F.R., 1986: Kinetic, inhibition and stability properties of a commercial β -d-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1438-1442.
 - 21 LENDERS, P.J., GERMAIN, P. and CRICHTON, R.R., 1985: Immobilization of a soluble chemically thermostabilized enzyme. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 572-578.
 - 22 KOIZUMI, J., ZHANG, M., IMANAKA, T. and AIBA, S., 1990: Dose single-amino-acid replacement work in favor of or against improvement of the thermostability of immobilized enzyme?. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3612-3614.
 - 23 SINGH, A., AGRAWAL, K.A., ABIDI, B.A. and DARMWAL, S.N., 1990: Properties of cellobiase from *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 356-358.
 - 24 SUZUKI, Y., YUKI, T., KISIGAMI, N. and ABE, S., 1976: Purification and properties of α -glucosidase of thermophile, *Bacillus thermoglucosidus* KP 1006. *Biophys. Acta.* **445**, 386-397.