

Acinetobacter sp.B-126株の菌体から抽出した β -グルコシダーゼおよび α -1,2-マンノシダーゼの精製とその性質

誌名	山形大学紀要. 農学
ISSN	05134676
巻/号	133
掲載ページ	p. 247-254
発行年月	2000年2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



Acinetobacter sp. B-126株の菌体から抽出した β -グルコシダーゼ および α -1,2-マンノシダーゼの精製とその性質

河東田 茂 義・雅楽川 憲 子・三 浦 里 美
鈴 木 久 恵・森 井 直 也

山形大学農学部生物資源学科生物資源利用化学講座
(平成11年10月1日受理)

Purification and Characterization of β -Glucosidase
and α -1,2-Mannosidase from Intact Cells of
Acinetobacter sp. strain B-126

Shigeyoshi KATOYODA, Noriko UTAGAWA, Satomi MIURA,
Hisae SUZUKI, and Naoya MORII

Section of Bioresource Utilization, Department of Bioresource Engineering,
Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka 997-8555, Japan
(Received October 1, 1999)

Summary

A kind of β -glucosidase and 1,2- α -mannosidase were purified from the intact cells of *Acinetobacter* sp. strain B-126 grown in the medium containing laminaran or baker's yeast mannan as a carbon source, respectively. The enzymes contained with intact cells were extracted with phosphate buffer containing 2M NaCl, purified by consecutive column chromatography. β -Glucosidase and 1,2- α -mannosidase had a mass of about 50kDa and 60kDa, respectively, as determined by both SDS polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration chromatography. The enzymes had a neutral optimum pH (7.0). β -Glucosidase split laminaran, laminarioligosaccharides, baker's yeast glucans, pustulan and ρ NP- α -D-glucopyranoside to produce specifically glucose, but not split curdlan and schizophyllan. α -1,2-Mannosidase split α -1,2-linked D-mannose oligosaccharides and baker's yeast mannan to produce specifically mannose, but not split ρ NP- α -D-mannanopyranoside.

Key words: β -glucosidase, 1,2- α -mannosidase, bacterium, *Acinetobacter* sp. strain B-126

緒 言

著者らは、以前、*Acinetobacter* sp. B-126株が、パン酵母細胞を炭素源としたとき、 α -マンノシダーゼ¹⁾および β -1,6-グルカナナーゼ²⁾を菌体外に生産し、さらに、これらの酵素が酵母の細胞壁多糖の構造解析に有用であることを示した³⁻⁸⁾。細菌の菌体外エンド- β -1,3-グルカナナーゼはすでにいくつかの報告がある⁹⁾が、酵母のグルカンに作用する細菌の β -グルコシダーゼの報告は少ない⁹⁾。一方、酵母マンナンに作用する細菌の菌体外 α -マ

ンノシダーゼは多くの報告がある^{1, 10-12)}。しかし、これらの酵素が菌体から抽出されたという報告はない。

われわれは*Acinetobacter* sp. B-126株を、炭素源としてラミナランあるいは酵母マンナンを用いて培養した場合、それぞれ培地に産生した β -グルコシダーゼと α -1,2-マンノシダーゼよりも菌体から抽出したときに、簡単な手順でより高い比活性のこれらの酵素を高収量で精製することができた。精製後得られたそれらの酵素の性質を検討した。

材料および方法

キーワード: β -グルコシダーゼ, α -1,2-マンノシダーゼ, 細菌, *Acinetobacter* sp. B-126株

1. 使用菌株と培養方法

β -グルコシダーゼおよび α -1,2-マンノシダーゼを産

生するために、以前に著者らが分離同定した *Acinetobacter* sp. B-126株²⁾ を使用した。前培養および本培養は炭素源として β -グルコシダーゼの産生のために0.5%のラミナラン（東京化成工業(株)）、 α -1,2-マンノシダーゼの産生のために市販のパン酵母から調製した0.5%の酵母マンナン¹⁾を用い、他にペプトン 0.5%、酵母エキス 0.5%、 KH_2PO_4 0.2%、0.1% MgSO_4 、0.1%および $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%（いずれも w/v）を加え pH を 7.0 に調整した培地を用いた。普通寒天培地から上記の組成に 2% の寒天を含む斜面培地に移植した後、30°C で 3 日間前培養した。前培養した菌体を生理食塩水に懸濁し、660 nm の吸光度で約 0.8 に調整し、その懸濁液 2 ml を上記の培地 100 ml に接種して 30°C で 3 日間の本培養を行った。培養後、遠心分離（10,000×g、15分）により上清と沈殿に分け、上清は培養上清、沈殿は菌体として回収した。

2. 菌体からの酵素の精製方法

菌体を 1/15M リン酸緩衝液（pH 7.0）で 2 回遠心洗浄した後、少量の 2M の NaCl を含む同緩衝液に 30 分間懸濁して氷冷下で酵素を抽出した。抽出後、遠心分離（10,000×g、15分）により回収した上清は、1/15M リン酸緩衝液（pH 7.0）で 2 日間透析し粗酵素液を得た。

粗酵素液は排除限界分子量 10,000 の限外濾過により約 1/10 に濃縮後、既報^{1), 2)} に示したと同様な条件で順次、DEAE-cellulose、DEAE-Sephadex A-50 および Sephadex G-150 のカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

3. 酵素活性の測定

それぞれの酵素の精製段階における酵素活性は以下のように測定した。基質として β -グルコシダーゼには ρ -ニトロフェニル- β -グルコシド (ρ -NPG)、 α -1,2-マンノシダーゼにはパン酵母マンナンを用い、適当量の酵素液を 0.017M リン酸緩衝液（pH 7.0）に懸濁し、30°C で 2 時間反応させ、生成した ρ -ニトロフェノール (ρ -NP) あるいは還元糖量を測定した。酵素活性の単位は、基質を分解して生成する ρ -NP あるいはマンノースに相当する還元糖量から kat をもとめて示した。 β -グルコシダーゼの基質特異性を調べるための基質の調製方法は Table 2 の脚注に示した。 α -マンノシダーゼの基質特異性を調べるための基質の調製方法は Table 4 の脚注に示した。特にふれない基質は市販品を用いた。マンノオリゴ糖は以下のように調製した。マンナンのアセトリシスおよび脱アセチル化は既報の方法¹⁾で行った。マンノオリゴ糖の分離は Araki および Kitamikado¹⁰⁾ の示した薄層クロマトグラフィー法に従って行った。それぞれの酵素によ

る加水分解生成物の確認のために、上記の基質（0.5%）0.1ml に 0.1ml の精製酵素溶液（0.68nkat）と 0.2ml の 1/15 M リン酸緩衝液（pH 7.0）を加え 30°C で 2 時間反応させた。生成したグルコースあるいはマンノースに相当する還元糖量を求め、 β -グルコシダーゼの場合はラミナランに対する相対活性を、 α -1,2-マンノシダーゼの場合にはパン酵母マンナンに対する相対活性を 100 とし、それぞれの基質の分解量とした。 β -グルコシダーゼによる分解生成物は既報²⁾と同様にペーパークロマトグラフィーで確認し、 α -1,2-マンノシダーゼの作用様式の確認は前述¹⁰⁾の薄層クロマトグラフィー法に従って行った。最適 pH、pH 安定性、最適温度および温度安定性の検討のために、基質として β -グルコシダーゼの場合には 20mM の ρ -NPG、 α -1,2-マンノシダーゼの場合には 0.5% のパン酵母マンナンを用いた。最適 pH および pH 安定性のための 1/15M の緩衝液は酢酸緩衝液（pH 4.0-5.0）、リン酸緩衝液（pH 5.5-8.0）および炭酸緩衝液（pH 8.5-9.0）を用いた。酵素液、基質、緩衝液の混合比は 2 : 1 : 1 で測定した。

4. 分析方法

精製したそれぞれの酵素の分子量測定のための SDS ゲル電気泳動は Weber と Osborn の方法¹¹⁾に従って行った。酵素の加水分解により生成した還元糖量はジニトロフタル酸法¹²⁾により測定した。タンパク質は Lowry らの方法¹³⁾により測定した。

結果および考察

1. β -グルコシダーゼの精製と性質

6 l の培養から得られた *Acinetobacter* sp. B-126 株の菌体に含まれる β -グルコシダーゼの精製過程を Table 1 に示した。同時に得られた培養上清を測定したところ、全活性は 4.8 μ kat であり、菌体から抽出した全活性の方が約 2.3 倍高く、 β -グルコシダーゼを効率よく精製できることが示唆された。菌体から最終的に精製した β -グルコシダーゼの比活性は 181.1 μ kat/g であり、その収量は 61% であった。Han と Srinivasan¹⁷⁾ は炭素源にラクトースを用いて培養することにより、*Alcaligenes faecalis* の培養上清から β -グルコシダーゼを得ているが、彼らの最終精製段階での収量（9.5%）よりも著しく高かった。SDS ゲル電気泳動および Sephadex G-150 ゲル濾過の結果（Fig. 1）、分子量は約 50,000 と推定したが、Han と Srinivasan¹⁷⁾ により報告された β -グルコシダーゼ（分子量 120,000-150,000）より低分子であった。

Table 1. Summary of the Purification of β -Glucosidase from *Acinetobacter* sp.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (μ kat)	Specific activity (μ kat/g)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell extract	364	11.0	30.2	1.0	100
DEAE-cellulose	143	9.3	65.0	2.2	85
DEAE-Sephadex	62	7.1	114.5	3.8	65
Sephadex G-150	37	6.7	181.1	6.0	61

この β -グルコシダーゼの基質特異性を調べるために、種々の β -結合を有するグルカンおよびオリゴ糖に作用させ、ラミナランに対する相対活性を100としたときの結果をTable 2に示した。 β -6位で分岐鎖を有する β -1,3-グルカンであるラミナランおよびラミナリンに対しては高い相対活性を示したが、前者はより多くの短い分岐鎖を有していることが報告されている¹⁾。さらにゲンチオビオース、セロビオースおよびラミナリオリゴ糖に対して強い相対活性を示した。一方、長鎖の β -グルコシド結合を有するパン酵母のアルカリ可溶性およびアルカリ不溶性グルカンと β -3位でごくわずかの分岐鎖を有する β -1,6-グルカンであるパスツランに対しては弱い活性を示した。直鎖の β -1,3-グルカンであるカードラン、直鎖の β -1,3-結合の主鎖の3個に1個の割合で β -6位で1個のグルコース残基を持つシゾフィランおよび直鎖の β -1,4-グルカンであるCM-セルロースには全く作用しなかった。試験したすべてのラミナリオリゴ糖は8時間の反応後、すべてグルコースに加水分解されていたことをペーパークロマトグラフィーによって確認した(結果は省略)。これらの結果から、この酵素はより短い直鎖の β -グルコシド結合の糖鎖、特にラミナリオリゴ糖に最も作用しやすい β -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) と思われる。OzakiとYamada¹⁹⁾ およびNunouraら²⁰⁾ は炭素源にセロビオースを用いてそれぞれ *Streptomyces* sp. および *Bifidobacterium breve* を培養した場合、産生される β -グルコシダーゼはいずれもセロビオース、ラミナリビオースおよびゲンチオビオースを加水分解したが、最も良い基質はそれぞれセロビオースとラミナリビオースであり、本酵素とは異なっていた。われわれはゲンチオビオースを炭素源として *Acinetobacter* sp. B-126株を培養すると菌体に含まれる β -グルコシダーゼが産生されることを確かめている(未発表データ)が、今後これらのビオースの β -グルコシダーゼの産生への影響は

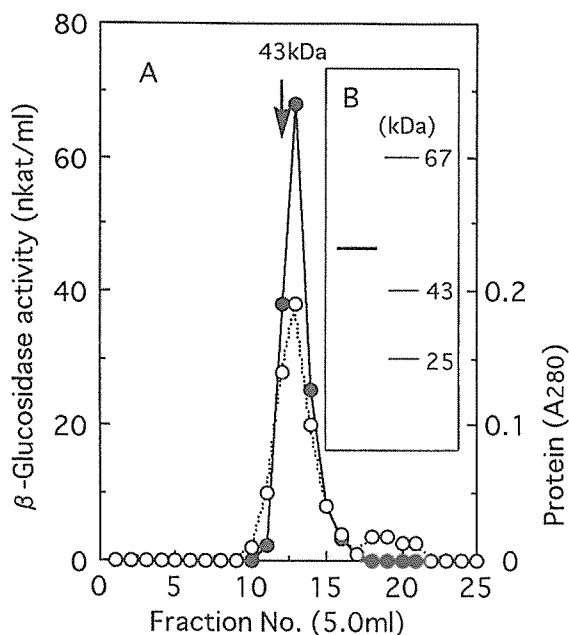


Fig. 1. Analysis of the purity of β -glucosidase by Sephadex G-150 column chromatography and SDS-PAGE.

A: Five ml of concentrated enzyme in purification step on DEAE-Sephadex (Table 1, 2mg protein) was placed on Sephadex G-150 column (1.8×40cm) and eluted with 0.01M sodium citrate buffer (pH 7.0). The flow rate was 8ml/hr. ●, β -glucosidase activity; ○, protein concentration.

B: Disk gel electrophoresis was performed in 10% polyacrylamide and 0.1% SDS with a discontinuous Tris-glycine buffer system (pH6.8 and 8.8) as described by the method of Davis²¹⁾, and SDS gel electrophoresis carried out by the method of Weber and Osborn²²⁾ using 20 μ g of the enzyme purified by the Sephadex G-150 column chromatography. Numbers on the right of SDS-PAGE are molecular masses (in kilodaltons) of the markers. The left is the purified enzyme.

Table 2. Substrate Specificity of the Purified β -Glucosidase from *Acinetobacter* sp.

Substrate	Relative rate (%)
Laminaran	100
Laminarin ^a	56.5
Gentiobiose	42.8
Cellobiose	17.8
Alkali-soluble glucan ^b	12.1
Pustulan	8.9
Alkali-insoluble glucan ^b	0.3
Curdlan	0
Schizophyllan	0
CM-cellulose	0
Laminarihexaose	+ ^c
Laminaripentaose	+ ^c
Laminaritetraose	+ ^c
Laminaritriose	+ ^c
Laminaribiose	+ ^c
ρ -Nitrophenyl β -D-glucoside	48.0 ^d

^a Laminarin was obtained from Nakarai Chemicals Ltd., Kyoto, Japan.

^b Alkali-soluble and -insoluble glucan were prepared from cell walls of baker's yeast.⁷⁾

^c The action pattern of the enzyme on the laminari-origosaccharides was tested by PPC.²⁾ The laminari-origosaccharides were completely hydrolyzed, and only glucose was produced as a final product.

^d The relative rate of hydrolysis of ρ -Nitrophenyl β -D-glucoside was calculated from the amount of ρ -nitrophenol.

検討課題である。

この酵素のラミナランに対する最適pHは6.0から8.0であり、pH安定性は5.5から8.0であった。この酵素は1/15 Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 中において、最適温度は35℃から45℃であり、5℃では少なくとも8カ月以上、35℃で30分間の加熱では安定していたが、45℃以上の温度で

は失活した。この酵素の最適pHはHanとSrinivasan¹⁷⁾ (pH6.0から7.0)、OzakiとYamada¹⁹⁾ (pH6.0から6.5) およびNunouraら²⁰⁾ (pH5.5付近) の β -グルコシダーゼに比べやや幅広い傾向を示したが、pH安定性と最適温度はいずれの酵素ともほぼ同じであった。

Table 3. Summary of the Purification of α -1,2-Mannosidase from *Acinetobacter* sp.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (μ kat)	Specific activity (μ kat/g)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell extract	218	9.8	44.9	1.0	100
DEAE-cellulose	35	3.8	108.5	2.4	39
DEAE-Sephadex	18	3.0	166.7	3.7	31
Sephadex G-150	14	2.4	171.4	3.8	24

2. α -1,2-マンノシダーゼの精製と性質

5 ℓ の培養から得られた *Acinetobacter* sp. B-126株の菌体に含まれる α -マンノシダーゼの精製過程を Table 3 に示した。同時に得られた培養上清を測定したところ、全活性は 3.2μ kat であり、菌体から抽出した酵素活性が約 3.1 倍高かった。菌体から最終的に精製した α -マンノシダーゼの比活性は 171.4μ kat/g であり、その収量は 24% であった。Maruyama ら¹²⁾ は *Bacillus* sp. を、炭素源として *Saccharomyces cerevisiae* のマンナンを用いて培養することにより、その培養上清から α -1,2-マンノシダーゼを得ているが、彼らの最終精製段階での収量 (23%) と類似していた。SDSゲル電気泳動および Sephadex G-150ゲル濾過の結果 (Fig. 2)、分子量は約 60,000 と推定したが、Maruyama ら¹²⁾ により報告された α -1,2-マンノシダーゼ (分子量 380,000) より低分子であった。しかし、著者らが先に *Acinetobacter* sp. B-126株をパン酵母の菌体を炭素源として培養して得た培養上清から精製した α -マンノシダーゼの分子量 (15,000)¹⁾ よりは高かった。今回得られた α -マンノシダーゼとこの α -マンノシダーゼの分子量の違いは今後の検討課題である。

この α -マンノシダーゼの基質特異性を調べるために、種々の α -結合を有するマンナンおよびマンノオリゴ糖に作用させ、パン酵母マンナンに対する相対活性を 100 とした結果を Table 4 に示した。*S. cerevisiae* X2180-1B-4²¹⁾ および *Zygosaccharomyces rouxii* IFO 0505⁶⁾ から得たマンナンは主鎖が α -1,6-マンノシド結合の直鎖に 1 個あるいは 2 個の α -1,2-マンノシド結合の側鎖のみを有していることが知られている。これらのマンナンに対する相対活性は、側鎖の非還元末端に α -1,2-および α -1,3-マンノシド結合を有するパン酵母マンナンに対するよりも高かった。一方、*S. cerevisiae* X2180-1B-4 の α -1,6-マンノシド結合の主鎖のみのマンナンにはこの酵素は全く作用しなかった。さらに α -1,3-マンノシド結合の非還

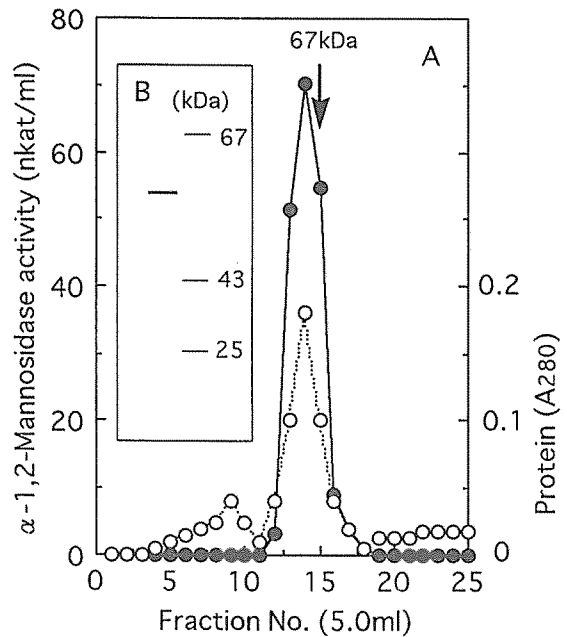


Fig. 2. Analysis of the purity of α -1,2-mannosidase by Sephadex G-150 column chromatography and SDS-PAGE

A : Five ml of concentrated enzyme in purification step on DEAE-Sephadex (Table 3, 2mg protein) was placed on the Sephadex G-150 column (1.8 \times 40cm) and eluted with 0.01M sodium citrate buffer (pH 7.0). The flow rate was 8ml/hr. ●, α -1,2-mannosidase activity ; ○, protein concentration.

B : Disk gel electrophoresis was carried out as shown in Fig. 1 using 20 μ g of the enzyme purified by the Sephadex G-150 column chromatography. Numbers on the right of SDS-PAGE are molecular masses (in kilodaltons) of the markers. The left is the purified enzyme.

Table 4. Substrate Specificity of the Purified α -1,2-Mannosidase from *Acinetobacter* sp.

Substrate	Relative rate (%)
Mannans ^a	
Baker's yeast	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180-1B-4 ^b	153
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> IFO 0505	106
<i>S. cerevisiae</i> X2180-1B-4 backbone ^c	0
α -Mannooligosaccharides ^d	
Mannotetraose	0
Mannotriose	+ ^e
Mannobiose	+ ^e
<i>p</i> -Nitrophenyl α -D-mannoside	0

^a Mannans were prepared by the procedure as described previously.^{1,6)}

^b The strain was kindly provided by Prof. Tasuku Nakajima at Tohoku University.

^c The mannan was prepared by digestion of *S. cerevisiae* X2180-1B-4 mannan with *Acinetobacter* sp. α -mannosidase.¹⁾

^d The oligosaccharides were prepared from mannan of baker's yeast by acetolysis.

^e The action pattern of the enzyme on the oligosaccharides was tested by TLC according to the method of Araki and Kitamikado.¹⁹⁾ Only mannose was produced as a final product.

元末端を有する α -1,2-マンノシド結合のマンノテトラオース [Man (α 1-3) Man (α 1-2) Man (α 1-2) Man] も全く分解されなかった。 α -1,3-あるいは α -1,2-マンノシド結合の非還元末端を有する α -1,2-マンノシド結合のマンノトリオース ([Man (α 1-3) Man (α 1-2) Man] あるいは [Man (α 1-2) Man (α 1-2) Man]) および 1,2-マンノシド結合のマンノビオース [Man (α 1-2) Man] はこの酵素によって分解されマンノースのみを生成した (結果は省略)。 *p*-ニトロフェニルマンノシドは分解されなかった。これらの結果からこの酵素は α -1,2-マンノシダーゼ (EC 3.2.1.24) と決定した。

この精製酵素のパン酵母マンナンに対する最適pHは

7.0であり、pH安定性は5.0から9.0であった。この酵素は 1/15Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 中において、最適温度は 40℃であり、5℃では少なくとも6カ月、40℃で30分間の加熱では安定していたが、45℃以上の温度では失活した。これらの性質はMaruyamaらの α -1,2-マンノシダーゼ¹²⁾ とほぼ類似していた。

以上に示したように、*Acinetobacter* sp. B-126株を、炭素源としてラミナランあるいは酵母マンナンを用いて培養した場合、それぞれ培地に産生した β -グルコシダーゼと α -1,2-マンノシダーゼよりも菌体から抽出したときに、簡単な手順でより高い比活性のこれらの酵素を高収量で精製することができた。しかし、菌体からこれらの

酵素を抽出する際に、抽出過程でタンパク質分解酵素の関与が考えられる。今後、タンパク質分解酵素阻害剤を用いるなどの抽出条件の検討が必要と思われる。

引用文献

- 1) Katohda, S., Sawaya, Y., Asatsuma, K., Suzuki, F., and Hayashibe, M. (1977) Purification and some properties of α -mannosidase. *Agric. Biol. Chem.* 41 : 331-337.
- 2) Katohda, S., Suzuki, F., Katsuki, S., and Sato, T. (1979) Purification and some properties of β -1,6-glucanase from *Acinetobacter* sp. *Agric. Biol. Chem.* 43 : 2029-2034.
- 3) Katohda, S., Tsukinaga, M., Tobinai, Y., and Sato, T. (1982) Cell wall composition of yeast- and rod-forms of *Candida krusei*. *Agric. Biol. Chem.* 46 : 1131-1137.
- 4) Katohda, S., Konno, K., Sasaki, Y., Suzuki K., and Sakamoto, S. (1984) Isolation and composition of the spore wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* 48 : 895-901.
- 5) Katohda, S., Ito, H., Takahashi, H., and H. Kikuchi, H. (1988) Carbohydrate composition during germination and outgrowth of ascospores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* 52 : 349-355.
- 6) Katohda, S., Taniguchi, K., Sumi, H., and Nakajima, S. (1991) Cell wall composition of *Zygosaccharomyces rouxii* after a shift to a high concentration of NaCl. *Agric. Biol. Chem.* 55 : 2757-2763.
- 7) 河東田茂義 (1993) 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生活環における細胞壁構成多糖成分と β -グルカナーゼ活性の変動に関する研究. 山形大学紀要 (農学) 別冊. 11 : 907-956.
- 8) 大野正博・河東田茂義 (1996) *Hasagawaea japonica* の二形性と細胞壁構成多糖. *Nippon Nogeikagaku kaishi* 70 : 781-786.
- 9) Fleet, G. H. (1991) Cell walls. 199-277. *The Yeast*, Vol. 4, (eds. Rose, A. H. and Harrison, J. S.) Academic Press Ltd., London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, and Toronto.
- 10) Jones, G. H. and Ballou, C. E. (1969) Studies on the structure of yeast mannan. *J. Biol. Chem.* 244 : 1043-1051.
- 11) Yamamoto, S. and Nagasaki, S. (1975) Purification and characterization of an exo- α -1,2-mannanase from *Flavobacterium dormitator* var. *gluconolyticae*. *Agric. Biol. Chem.* 39 : 1981-1989.
- 12) Maruyama, Y., T. Nakajima T.; and E. Ichishima, E. (1994) A 1,2- α -mannosidase from a *Bacillus* sp. : purification, characterization, and mode of action. *Carbohydr. Res.* 251 : 89-98.
- 13) Araki, T. and Kitamikado, M. (1982) Purification and characterization of a novel exo- β -mannanase, *J. Biochem.* 91 : 1181-1189.
- 14) Weber, K. and Osborn, M. (1969) The relativity of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244 : 4406-4412.
- 15) 百瀬 勉・矢野良子 (1963) 3,6-ジニトロフタル酸による糖の微量定量. *化学の領域*. 17, 891-895.
- 16) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- 17) Han, Y. W. and Srinivasan, V. R. (1969) Purification and characterization of β -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*, *J. Bacteriol.* 100 : 1355-1363.
- 18) Davis, B. J. (1964) Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins, *Ann. N. Y. Acad. Soc.* 121 : 404-413.
- 19) Ozaki, H. and Yamada, K. (1991) Isolation of *Streptomyces* sp. producing glucose-tolerant β -glucosidases and properties of the enzymes. *Agric. Biol. Chem.* 55 : 979-987.
- 20) Nunoura, N., Ohdan, K., Yano, T., Yamamoto, K., and Kumagai, H. (1996) Purification and characterization of β -D-glucosidase (β -D-fucosidase) from *Bifidobacterium breve* clb acclimated to glucose. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 : 188-193.

- 21) Ballou, C. E., Kern, K. A., and Raschke, W. C. (1973) Genetic control of yeast mannan. J. Biol. Chem. 248 : 4667-4673.