

テンペ製造菌 *Rhizopus oligosporus* による 加水分解酵素の生産

岡留美穂、岡田弥生、大野信子

Production of Hydrolases by a Tempeh Manufacturing Fungus, *Rhizopus oligosporus*

Miho OKADOME, Yayoi OKADA and Nobuko OHNO

Rhizopus oligosporus is the main manufacturing fungus of a soybean fermented food, tempeh. Informations are limited on cellulolytic enzymes related to the softening of soybean in the fermentation process. The extracellular productivity of various hydrolases by *R. oligosporus* is examined. *R. oligosporus* IFO 32002 produced cellulase (CMCase, 1.7U/ml), β -glucosidase (0.1U/ml), xylanase (0.8U/ml), amylase (3.9U/ml) and acid protease (0.01U/ml) in the solid medium using wheat bran as a sole carbon source. β -Xylosidase and alkaline protease hardly were produced. In comparison with other enzymes, the production of CMCase was achieved largest in the early time of the culture. The productions of CMCase, β -glucosidase, xylanase and amylase increased to 1.5 times by the addition of yeast extract, 3.1 times by peptone, 1.4 times by ammonium sulfate and 2.3 times by ammonium sulfate, respectively. The production of acid protease increased to 4.7 times, when this fungus was cultivated on the solid medium containing both wheat bran and defatted soymeal.

Key words : *Rhizopus oligosporus*, Cellulase, CMCase, Wheat bran, Tempeh

キーワード : *Rhizopus oligosporus*、セルラーゼ、CMCアーゼ、フスマ、テンペ

緒 論

Rhizopus oligosporus は大豆発酵食品テンペの主要製造菌である。テンペはインドネシアの伝統的な大豆発酵食品で、大豆を加熱脱皮し、バナナ葉に包み発酵させて製造する。発酵はバナナ葉由来の *Rhizopus* 属に属する特定のカビにより起きるが、本菌は煮大豆での生育

がよく、テンペ製造における最も主要な微生物とされている¹⁾。発酵中、製造菌の作用で大豆タンパク質の分解により遊離アミノ酸が増加する。また、大豆油中の中性脂肪の約3分の1は発酵中に分解されるといわれ、遊離脂肪酸の量が著しく増加する。さらにビタミンB類の含量が増加し、また抗酸化性の強いイソフラボン化合物が生成することが明らかにされている²⁾。これらの作用は発酵中に製造菌が生産する加水分解酵素によるところが大きい。*R. oligosporus*が発酵中にセルラーゼ (CMCase、 β -グルコシダーゼ)、キシラナーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼやリパーゼなどの加水分解酵素を生産することが報告されている³⁻⁷⁾。

これらテンペ製造菌の生産する酵素に注目し、デンプン廃液や、米糠を培地に用いテンペ製造菌を培養し、グルコアミラーゼ⁸⁾やプロテアーゼ⁹⁾生産なども試みられているが、繊維分解に関わる酵素の研究例は少ない。*R. oligosporus*の繊維分解作用に関しては、おからを用いた味噌風調味料の製造の際、*Rhizopus* 麴が *Aspergillus* 麴と比較して強いセルラーゼ活性を持つこと¹⁰⁾や、*R. oligosporus*が *R. javanicus* や *R. arrhizus* と比較して大豆の軟化力が強いこと³⁾を示す報告などがある。繊維成分のひとつであるセルロースの分解に関して、セルロース粉末、濾紙、微結晶セルロースやカルボキシメチルセルロース (CMC) に活性を示す酵素が多く微生物について報告されている。上記報告において *R. oligosporus* の大豆繊維分解や大豆軟化作用にCMCaseとの関連を示唆する内容が示されているが、本菌のCMCaseに関して精製酵素レベルで検討された報告は見当たらない。

よって本研究では、*R. oligosporus*が細胞外に生産する加水分解酵素、特に繊維分解に関わる酵素に着目し、本菌の培養条件について検討した。

材料および方法

1. 使用菌株とその保存

使用菌株は、(財)発酵研究所から分与された *Rhizopus oligosporus* IFO 32002を用いた。菌株の保存には、ポテトデキストロース寒天斜面培地 (DIFCO) を用いて30℃で5～7日間培養後、4℃で保存した。保存菌株は2ヶ月毎に継代培養をした。

2. 培地組成および培養方法

酵素の生産性を調べるために洗浄小麦フスマ (以下単にフスマと記す) を基本とした培地に、無機窒素源、有機窒素源、脱脂大豆粉末を用い条件に従って混合して固体培地を調製した。

洗浄フスマは、小麦フスマを水とエタノールで数回洗浄した後、おがくず大に粒度を揃え

たもので、洗浄によって原料のフスマに対して重量が約半分になっている製品を日東製粉(株)より提供を受けて使用した¹¹⁾。

供試菌の酵素生産性を調べるため、500ml容三角フラスコに各々の成分で固体培地を作り、オートクレーブにて121℃、20分の条件下で滅菌したものに、上記斜面培地にて30℃、7日間培養した菌株を植菌した。

3. 粗酵素液の調製方法

上記静置培養後、500ml容三角フラスコ1個当たり10mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) 150mlを加え、攪拌し、130rpmで1時間振とうした。その懸濁液を濾過し、濾液を遠心分離して、得られた上清画分を粗酵素液とした。

4. 酵素活性測定法

セルラーゼ活性は、最終濃度2.5%となるようにカルボキシメチルセルロース (CMC, Wako)、アビセル (微結晶セルロース)、 α -セルロース (SIGUMA)、濾紙およびセロファンチューブをそれぞれL字型試験管に測り取り、さらに100mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1.0ml、蒸留水0.5mlを加え懸濁した。L字管は恒温水層中に設置したMonod振とう機に取り付け、これに酵素液を0.5ml加え50℃で20分反応させた。生じた還元糖をSomogyi-Nelson法^{12,13)}によって660nmにおける吸光度を測定し、定量して酵素活性を求めた。定量はグルコースを基準として作成した検量線から求めた。

β -グルコシダーゼ活性¹⁴⁾は、フェニル- β -D-グルコシド (SIGUMA) を20mMとなるように20mMの酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、その溶液0.25mlに酵素液を0.25ml加え、30℃で15分間反応後、550mM炭酸ナトリウムを2.5ml加え反応を停止させ、フェノール試薬を0.5ml添加し、30分後、反応したフェノールを660nmの吸光度で測定し、定量して酵素活性を求めた。

キシラナーゼ活性は、最終濃度0.5%となるようにキシラン (SIGUMA) をL字型試験管に測り取り、100mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1.0mlと蒸留水0.5mlを加え懸濁し、これを上記のセルラーゼの活性測定方法に準じて反応させた (ただし反応温度は30℃とした)。生じた還元糖をSomogyi-Nelson法^{12,13)}によって660nmの吸光度で測定し、定量して酵素活性を求めた。定量はキシロースを基準として作成した検量線から求めた。

β -キシロシダーゼ活性¹⁵⁾は、p-ニトロフェニルキシロシド (SIGUMA) を10mMとなるように20mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) で溶解して基質とした。この基質1.0mlと同緩衝液0.5mlに酵素液を0.5ml加え、30℃で30分間反応後、200mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 10.4) 3.0mlで反応を停止し、生じたp-ニトロフェノールを400nmで測定し、定量し

て酵素活性を求めた。

アミラーゼ活性は、加熱溶解させた2%可溶性デンプン溶液を基質とし、これを0.25mlと100mM酢酸緩衝液(pH 5.0) 0.5mlを混合したのち、酵素液を0.25ml加え、30℃で20分反応させ、生じた還元糖をSomogyi-Nelson法^{12,13)}によって、660nmにおける吸光度を測定し、定量して酵素活性を求めた。還元糖量はグルコースを基準として作成した検量線から求めた。

プロテアーゼ活性¹⁶⁾は、ミルクカゼインを2%となるように、酸性プロテアーゼの場合は100mM乳酸緩衝液(pH 3.0)に、アルカリ性プロテアーゼの場合は100mMリン酸緩衝液(pH 7.5)に溶解させ、それぞれ基質とした。各基質1.0mlを試験管にとり、酵素液0.5mlを加え、30℃、30分反応させた。その後、440mMトリクロロ酢酸水溶液を加え、再び30℃で30分間反応させた後、反応液を濾過した。得られた濾液を0.5mlとり、550mM炭酸ナトリウム水溶液2.5mlと混合し10分保ったのち、そこに0.2Nフェノール試薬を0.5ml加え30℃、20分反応させ分解物の生成量を660nmにおける吸光度を測定し、定量して酵素活性を求めた。分解物の量はチロシンを標準物質とした検量線から求めた。

なお、セルラーゼ、アミラーゼとキシラナーゼの酵素活性の単位は上記各条件下で、1分間に1 μ molのグルコースまたはキシロースに相当する還元糖を遊離する酵素量を1単位(unit:U)とした。 β -グルコシダーゼと β -キシロシダーゼの酵素活性は上記各条件下で、1分間に1 μ molのフェノール、またはp-ニトロフェノールを遊離する酵素量を1Uとした。プロテアーゼの酵素活性の単位は上記の条件下で、1分間に1 μ molのチロシンを遊離する酵素量を1Uとした。

5. 蛋白質の定量

蛋白質は牛血清アルブミンを標準物質として、Lowryら¹⁷⁾の方法に従って定量した。

実験結果および考察

1. *R. oligosporus* IFO 32002におけるフスマ培地上での各種加水分解酵素の生産経過

R. oligosporus IFO 32002を、フスマ10gに蒸留水30ml添加した培地(フスマ基本培地)を基本とした各培地に植菌し、各種加水分解酵素の生産性について調べた。

IFO 32002株の培養抽出液中にはセルロース分解酵素に関して、CM-セルロースを基質とした場合には強い活性(CMCCase)が検出されたが、アビセル、 α -セルロース、濾紙やセロファンチューブを基質とした場合、方法に示した測定法の条件下において活性はほとんど検出できなかった(Table 1)。

CMCaseは培養3日目、また、キシラナーゼは培養5~7日目、アミラーゼは7日目に生

Table 1. Activity of CMCase with Various Substrates

Cellulose	Activity (U/ml)
Avicell	N.D.
α -Cellulose	N.D.
Filter paper	N.D.
Cellophane	N.D.
CMC	1.5

The reaction on mixture was incubated under the standard enzyme assay conditions.

N.D. : Not detectable.

産はピークに達し、その後培養抽出液中の活性は減少した。 β -グルコシダーゼは培養日数とともに培養抽出液中の活性が増加した。プロテアーゼはわずかに生産が認められたが、時間経過とともに活性は検出されなくなった。なお、 β -キシロシダーゼの生産は確認できなかった (Fig. 1)。

菌の生育と酵素生産とを関係づけると、CMCase生産は本菌が培地上に広がる、いわば増殖期に生産され、菌糸が培地表面を覆い尽くす時期にピークとなり、それ以降は減少した。菌糸が培地を覆い、胞子が形成され出した時点でキシラナーゼ、アミラーゼの生産は最高に達した。 β -グルコシダーゼの生産が最高に達するのはその後であった。

2. フスマ培地における酵素生産に及ぼす窒素源の影響

フスマ基本培地に窒素源として硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、酵母エキスとペプトンを500ml容三角フラスコあたりそれぞれ0.5g添加し、それらが酵素生産に及ぼす影響につ

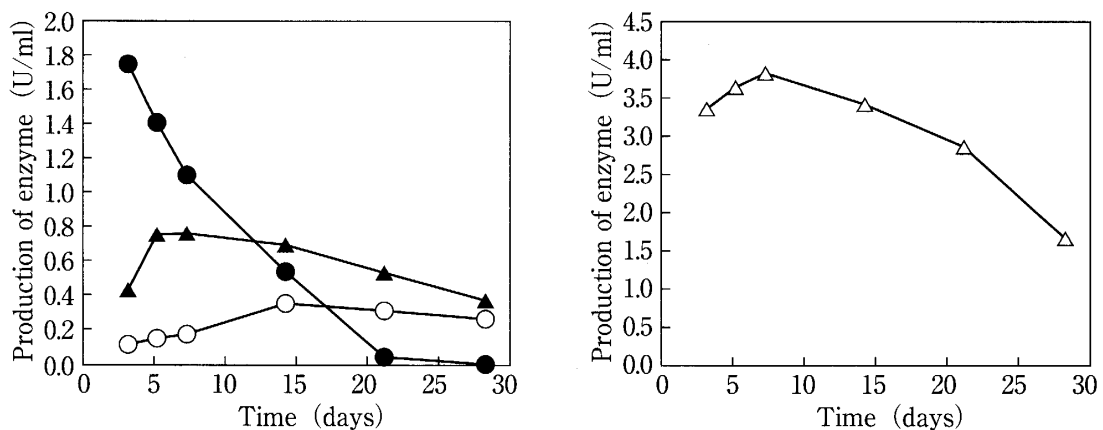


Fig. 1. Time Course of Production of Enzymes by *R. oligosporus* IFO 32002.

The organism was incubated in a 500 ml Erlenmeyer flask at 30°C.

(●) CMCase; (▲) Xylanase; (○) β -Glucosidase; (△) Amylase.

Table 2. Effect of Nitrogen Sources on Production of Enzymes by *R. oligosporus* IFO 32002

Nitrogen source (0.5g addition)	CMCase (U/ml)	β -Glucosidase (U/ml)	Xylanase (U/ml)	Amylase (U/ml)	Acid protease (U/ml)	Alkali protease (U/ml)
No addition	1.71	0.16	0.76	3.92	0.01	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.90	0.20	1.08	9.14	0.09	N.D.
NaNO ₃	2.15	0.18	0.99	6.24	0.09	N.D.
Yeast extract	2.52	0.33	0.87	6.48	N.D.	N.D.
Peptone	2.27	0.40	0.73	9.48	N.D.	N.D.

The organism was incubated in a 500 ml Erlenmeyer flask containing 0.5 g of each nitrogen source.

N. D. : Not detectable.

いて調べた (Table 2, Fig. 2)。

CMCase生産に及ぼす各窒素源の影響について検討した結果、酵母エキスを添加した培地
が最大の生産 (2.5U/mlの培養抽出液) を示した。いずれにしても調べた窒素源のすべてに
ついて、培養抽出液の活性は培養3日目に最大に達し、その後は低下した。酵母エキスの添
加がCMCase生産に有効であることがわかったので、その添加濃度の影響について調べた
(Fig. 2-A)。酵母エキスを1.0g添加しても0.5g添加したものと比較して生産量にほとんど
差がみられなかった。なお、酵母エキスの添加により基本培地と比較して、生産量は約1.5
倍となった。

β -グルコシダーゼの生産に及ぼす各窒素源の影響について検討した。無機窒素源は β -グ
ルコシダーゼの生産にほとんど影響がなかった。有機窒素源の添加は酵素生産量の増加に働
いた。用いたいずれの培地でも培養後期には胞子が形成されていたため胞子由来の酵素とも
考えられるが β -グルコシダーゼの生産に有機窒素源が有効であることが示唆された。特に
効果の大きかったペプトンを0.5gから1.0gに増やして添加した培地では、酵素の生産量は
増加し、生産のピークに達するまでの時間は短縮された (Fig. 2-B)。基本培地に比べペプ
トンを1.0g添加することにより酵素生産量は約3倍に増加した。

キシラナーゼの生産に及ぼす窒素源の影響について検討した。硫酸アンモニウムの添加は
酵素生産に効果を示したが、硝酸ナトリウム、酵母エキスの効果はほとんどなく、ペプトン
は阻害的に働いた。硫酸アンモニウムを1.0gに増加して添加しても0.5g添加した以上の効
果はなかった (Fig. 2-C)。なお硫酸アンモニウムの添加により基本培地に比べ酵素の生産
量は約1.4倍に増加した。

アミラーゼ生産に及ぼす各窒素源の影響について検討した。硫酸アンモニウムとペプトン
の添加が酵素生産に効果を示した。さらに硫酸アンモニウムとペプトンの添加量を1.0gに
増加して添加した培地の比較を行った。硫酸アンモニウムとペプトンの両者ともに0.5g添

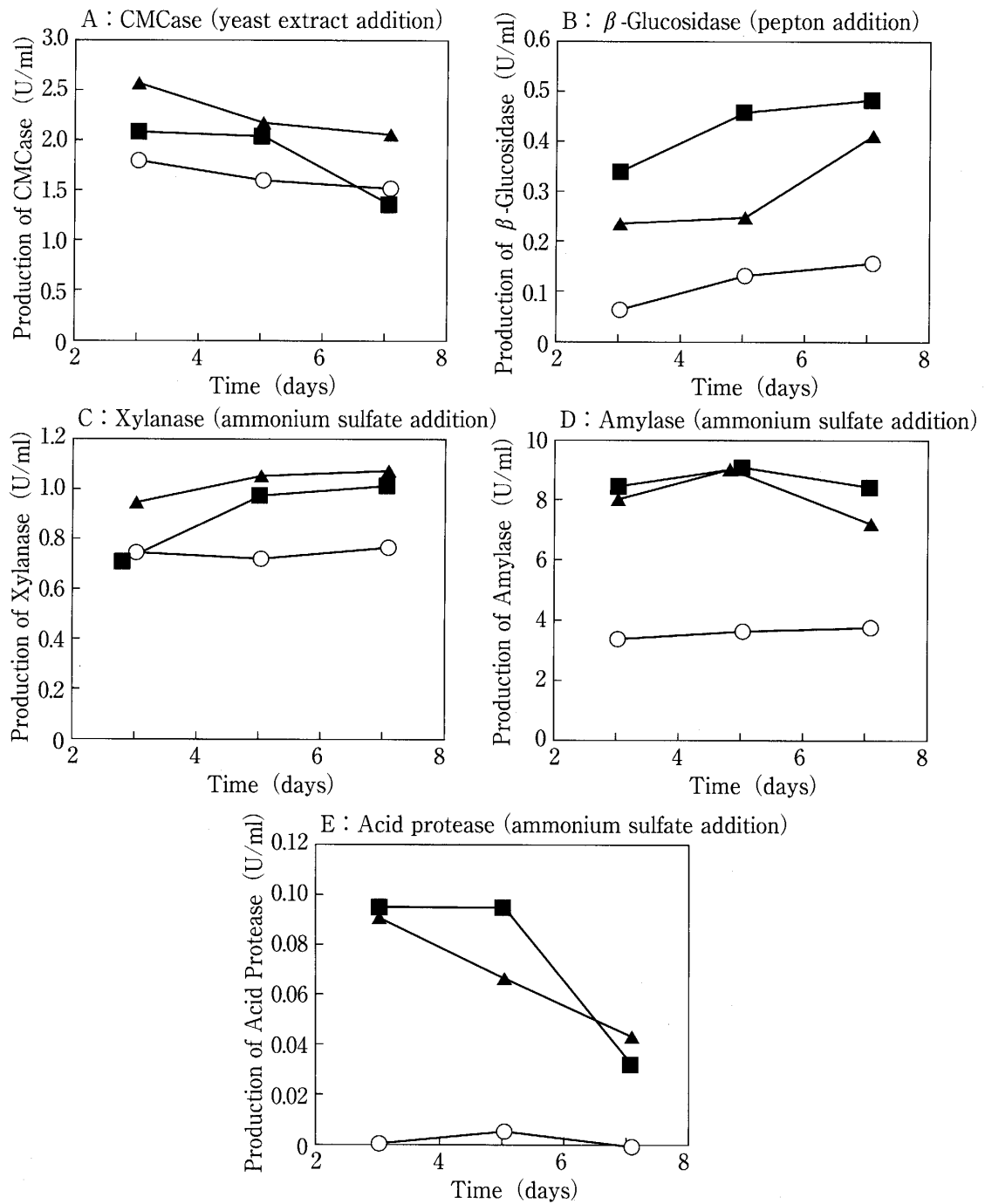


Fig. 2. Effect of Nitrogen Sources Addition on Production of Enzyme by *R. oligosporus* IFO 32002.

The organism was incubated in a 500 ml Erlenmeyer flask at 30°C.

Nitrogen Sources of 0.5g (▲) and 1.0g (■) was added to the basal medium (○).

加した以上の効果はなく、ペプトンを添加した培地は硫酸アンモニウムを添加した培地よりも蛋白質の生産量が多く、よって比活性が低くなった。硫酸アンモニウム1.0g添加培地の結果をFig. 2-Dに示す。なお硫酸アンモニウムの添加により基本培地に比べ酵素生産量は約2倍に増加した。

プロテアーゼ生産における各窒素源の影響について検討した。酸性プロテアーゼ生産には無機窒素源の添加が効果を示したが、有機窒素源の添加は効果がなかった。またアルカリ性プロテアーゼは窒素源を添加した培地では活性が検出できなかった。酸性プロテアーゼ生産について、さらに硫酸アンモニウムを1.0gに増加して添加し比較した (Fig. 2-E)。その結果、生産量の最大値に変化はなかったが生産の期間の維持に効果があった。硫酸アンモニウムの添加により基本培地と比較して酵素の生産量は約2.3倍に増加した。

β -キシロシダーゼの生産は、用いた培地で確認できなかった。

3. フスマ培地における脱脂大豆粉末添加が酵素生産に及ぼす影響

本菌は蒸煮大豆の発酵に関わる微生物であるため、培地に脱脂大豆粉末を用いて培養を試みた。フスマはオートクレーブ処理によっても固まることはなく培地の通気性は良好な状態を保つことができたが、脱脂大豆粉末はオートクレーブ処理により固まってしまい、これにより培養を行った場合には菌糸が十分に伸張していないことが観察された。さらに検討した結果、フスマに適当な濃度で脱脂大豆粉末を混ぜることにより菌糸が良好に成長する培地を調製することが出来たので、フスマ基本培地に脱脂大豆粉末を5g、10g、20gをそれぞれ添加し (10gに対し蒸留水15ml添加した)、これらの培地で生産されてくるCMCase、 β -グルコシダーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼとプロテアーゼについて調べた (Fig. 3)。

脱脂大豆粉末を添加した培地では、フスマ基本培地を用いた場合と比較して菌糸の成長が良好になり、培養1日目から、培地上に白い菌糸が観察され、3日目には培地全体が白い綿状の菌糸が覆った状態となった。本菌は脱脂大豆粉末添加培地での培養においてはほとんど胞子を形成することがなかった。

CMCase生産に及ぼす脱脂大豆粉末の添加効果についてFig. 3-Aに示した。脱脂大豆粉末の添加により、CMCaseの生産は増加した。大豆粉末の添加量に関わらず、どの培地でも菌糸がフスマに十分に広がった培養3日後に、粗酵素液中の酵素活性は最大に達し培養時間の経過とともに活性は減少していった。フラスコあたり5g以上の脱脂大豆粉末の添加は効果がなかった。脱脂大豆粉末添加により、フスマ基本培地と比較して生産量は最大1.4倍に増加した。

β -グルコシダーゼ生産に及ぼす脱脂大豆粉末の添加効果についてFig. 3-Bに示した。脱

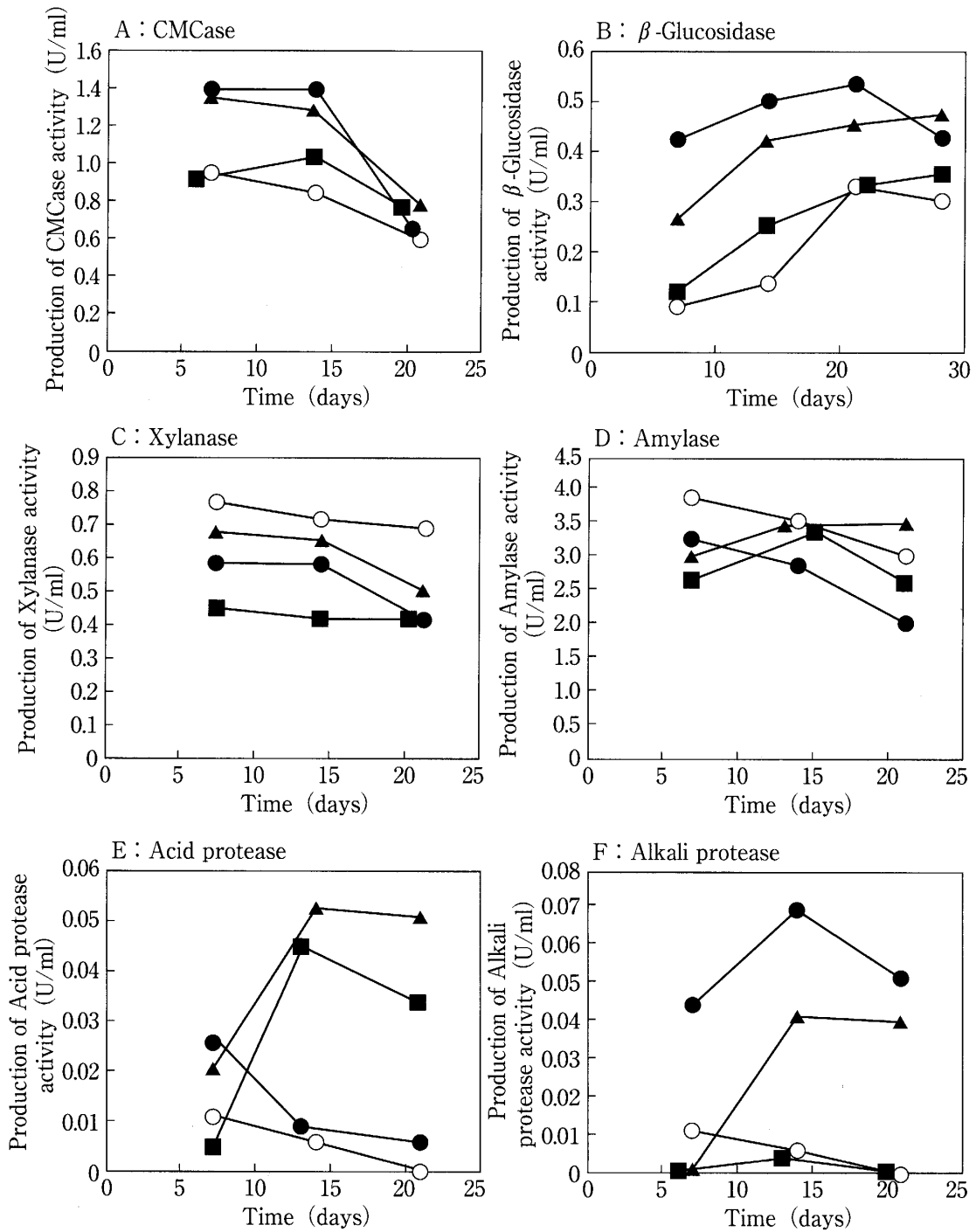


Fig. 3. Effect of Defatted Soy Flour Powder on Production of Enzyme by *R. oligosporus* IFO 32002.

The organism was incubated in a 500 ml Erlenmeyer flask at 30°C.

The defatted soybean flour of 5g (●), 10g (▲) and 20g (■) was added to the basal medium (○).

脂大豆粉末の添加により β -グルコシダーゼの生産は培養時間の経過とともに増加しておおよそ20日後に最大に達した。フスマ基本培地と比較して5g以上の添加は効果がなく結果的に5gの脱脂大豆粉末添加によりフスマ基本培地と比較して生産量は約1.4倍に増加した。

キシラナーゼ生産に及ぼす脱脂大豆粉末の添加効果についてFig. 3-Cに示した。キシラナーゼの生産量は脱脂大豆粉末の添加量が増加するに従って減少した。

アミラーゼ生産に及ぼす脱脂大豆粉末の添加効果についてFig. 3-Dに示した。アミラーゼ生産について脱脂大豆粉末の添加の効果はほとんど見られなかった。

プロテアーゼ生産に及ぼす脱脂大豆粉末の添加効果について、酸性プロテアーゼとアルカリ性プロテアーゼを、それぞれFig. 3-E, Fig. 3-Fに示した。酸性プロテアーゼは脱脂大豆粉末の添加により、生産量が増加したが、10g以上の添加は効果がなかった。脱脂大豆粉末10gの添加により、フスマ基本培地と比較して生産量は最大約4.7倍に増加した。アルカリ性プロテアーゼも脱脂大豆粉末の添加により生産量が増加したが5g以上の添加は効果がなかった。脱脂大豆粉末5gの添加により、フスマ基本培地と比較して、生産量は最大約3.7倍に増加した。

β -キシロシダーゼの生産は、用いた培地で確認できなかった。

培養条件の検討により、フスマを唯一の炭素源とした固体培地で*R. oligosporus* IFO 32002は良好に成育し、培養中にアミラーゼ、キシラナーゼ、CMCase、 β -グルコシダーゼとわずかにプロテアーゼを細胞外に生産することを見出した。さらに、フスマ培地に各種窒素源を添加し、それらの酵素生産に及ぼす影響について検討した。結果、酵母エキス添加によりCMCase、ペプトンの添加により β -グルコシダーゼ、硫酸アンモニウムの添加によりキシラナーゼとアミラーゼの生産量が増加することを見出した。また、脱脂大豆粉末の添加によって酸性プロテアーゼの生産量が増加した。特にCMCaseの生産時期が特徴的であった。本菌は、用いたすべての培養条件下で培地に菌糸が広がる時期にCMCaseを生産した。一般的にセルラーゼは適応酵素で誘導型の酵素といわれる¹⁸⁾。本菌培養の際、フスマが誘導剤として働いたと思われるが、本菌のCMCase生産パターンが、同様に誘導型の酵素であるキシラナーゼのような生産パターンを示さず、菌糸が広がる時期に限ってCMCaseを生産する性質は興味を持たれるところである。

要 約

Rhizopus oligosporus は、大豆発酵食品、テンペの主要な製造菌である。本菌による大豆

の発酵過程における軟化に関わる繊維素分解酵素についての情報は少ない。*R. oligosporus* による加水分解酵素の細胞外生産性が調べられた。

R. oligosporus IFO 32002は、小麦フスマを唯一の炭素源とする固体培地において、セルラーゼ (CMCase, 1.7U/ml)、 β -グルコシダーゼ (0.1U/ml)、キシラナーゼ (0.8U/ml)、アミラーゼ (3.9U/ml)、酸性プロテアーゼ (0.01U/ml) を生産した。 β -キシロシダーゼとアルカリプロテアーゼはほとんど生産されなかった。CMCの生産は、他の酵素と比較して、培養の早い時期に最大に達した。CMCaseの生産は、酵母エキスの添加で1.5倍に、 β -グルコシダーゼはペプトンによって3.1倍、キシラナーゼは硫酸アンモニウムによって1.4倍、アミラーゼは硫酸アンモニウムによって2.3倍に増加した。フスマと脱脂大豆粉末を含む培地で本菌を培養した場合に、酸性プロテアーゼの生産は4.7倍に増加した。

参考文献

- 1) 中野政弘、「発酵食品」、光琳全書、pp. 81-87 (1967)。
- 2) 渡辺篤二、海老根英雄、太田輝夫、「大豆食品」、光琳全書、208-217 (1971)。
- 3) Mamurukchinakorn, S. & Fusio, Y., Effect of enzymes on the degree of maceration of soy bean fermented by *Rhizopus* strains. *J. Agr., Kyusyu Univ.*, 42 (3-4), 231-237 (1997)
- 4) Varzakas, T., *Rhizopus oligosporus* penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe. *Process Biochemistry*, 33 (7), 741-747 (1998).
- 5) 江幡淳子、福田靖子、平井和子、村田希久、テンペイの抗酸化物質の生成に関与する β -グルコシダーゼ、農芸化学会誌、46 (7)、323-329 (1972)。
- 6) Ruiz-Tera'n, F. & Owens, J. D., Chemical and enzymic change during the fermentation of bacteria-free soya bean tempe. *J. Sci. Food Agric.*, 71, 523-530 (1996).
- 7) Hachmeister, K.A. & Fung, D.Y.C., Tempeh: A mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Criti. Rev. Microbiol.*, 19 (3), 137-188 (1993).
- 8) Han, B., van Leeuwen, H.J., Patel, B., Doelle, H.W., & Yu, Q., Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. *Process Biochemistry.*, 34, 59-65 (1999).
- 9) Ikasari, L. & Mitchell, D.A., Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology.*, 19, 171

-175 (1996).

- 10) 館 博、綾部浩太郎、菊池修平、おからを用いた味噌風調味料の製造 (第2報) 味噌の科学と技術、41 (5)、144-146 (1993)。
- 11) 佐々木康人、玉井洋介、林 洋一、窪田正二郎、藤尾高志、小笠原武雄、江藤祐嘉合、真田宏夫、綾野雄幸、ラットのコレステロール代謝に及ぼす小麦フスマの影響。日本栄養・食糧学会誌、44、461-470 (1991)。
- 12) Somogyi, M., Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19-23 (1952).
- 13) Nelson, N., A photometric adaptation of somogyi method for the determination. *J. Biol. Chem.* 153, 375-380 (1944).
- 14) Tuneo, Y. & Matsuo, M., β -Xylosidase/ β -Glucosidase of *Chaetomium trilaterale*. *Methods Enzymol.*, 160, 696-700 (1988).
- 15) John, M. & Schmidt, J.R., Xylanases and β -Xylosidase of *Trichoderma lignorum*. *Methods Enzymol.*, 160, 662-672 (1988).
- 16) 当山清善、杉森恒武、片桐英郎、麹菌のプロテアーゼの生産について (第1報) cell-free extractによるプロテアーゼの生成。醸工、36、355-359 (1960)。
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- 18) Okada, G., Purification of properties of Cellulase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.*, 49 5, 1257-1265 (1985).

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言を頂いた千葉大学園芸学部生物生産学科 藤井貴明教授、洗浄フスマを提供下さいました日東製粉株式会社に深く感謝申し上げます。

岡 留 美 穂 (家政学部健康栄養学科助手補)

岡 田 弥 生 (千葉大学大学院自然科学研究科)

大 野 信 子 (家政学部健康栄養学科教授)