

藻場の端脚類におけるセルラーゼの存在

森下 達雄・荒木 利芳・関口 秀夫・菅原 庸・上野 隆二
三重大学生物資源学部

On the Existence of Cellulase in Marine Gammarid Amphipods Inhabiting Seaweed Beds

Tatsuo MORISHITA, Toshiyoshi ARAKI, Hideo SEKIGUCHI,
Isao SUGAHARA and Ryuji UENO
Faculty of Bioresources, Mie University

Summary

High cellulase activity was detected in the extract of marine gammarid amphipods inhabiting seaweed beds. The cellulase was partially purified by ammonium sulfate precipitation and successive column chromatographies. One of the two fractions separated by Sephadex G-100 gel chromatography was C₁-cellulase (correspond to avicelase, E. C. 3. 2. 1. 91), which hydrolyzed more insoluble cellulose, avicel and filterpaper, than soluble cellulose, carboxymethylcellulose. The other was C_x-enzyme (correspond to CMCase, E. C. 3. 2. 1. 4), which cleaved more soluble carboxymethylcellulose. Both enzymes had pH optimum of around 5.5, and was fairly stable in a pH region of 5.0 to 8.0 for 20 hr at 30°C and was completely stable below 40°C for 30 min-incubation at pH 7.0. C₁- and C_x-enzymes had molecular weights of approximately 34,000 and 26,000, respectively. These cellulase were estimated to originate from gammarids in the absence of cellulolytic symbiotic bacteria.

Key words: cellulase, gammarids, seaweed beds, partial purification, some properties

藻場には、端脚類やアミ類、等脚類、カイアシ類などプランクトン性甲殻類が生息し、藻類に付着している微小生物や浮遊有機体を捕食している。その藻場にはそれらの小型甲殻類を餌とする幼・稚魚類やエビ・カニ類などが生息して、藻場における生物の食物連鎖が成り立っている。

1970年頃から、藻場に棲む端脚類のセルラーゼ (E. C. 3. 2. 1. 4.) 活性が報告されており、HALCROW¹⁾ が海産の *Gammarus oceanicus* に、MONK²⁾ が淡水産の *Gammarus pulex* にそれぞれ認めている。またアミ類の一部

でもセルラーゼ活性が認められている³⁾。それ以来、藻場の生物の食物連鎖系の見直しが必要であろうといわれてきた。しかし、セルラーゼ活性が認められたプランクトン性甲殻類は数例に過ぎず、そのセルラーゼ活性がそれらのプランクトン性甲殻類起源のセルラーゼによるものかも明確でない。著者らは、三重県英虞湾において、冬期から春期にかけて大量に発生する Gammarids (端脚類のヨコエビ類) にセルラーゼ活性を認めた。そこで、その存在の有無を明確にしようと考え、セルラーゼの分離・精製を試みるとともに、それが Gammarids 自身のものか、その起源についても検討を加えた。以下に得られた結果を報告する。

実験方法

供試材料

試料の Gammarids は冬期から春季 (12~4月) にかけて、三重県英虞湾内の藻場で採集された、主としてトゲホホヨコエビ *Paradexamine barnadi* (Amphipoda, Gammaridea) とアゴナガヨコエビ *Pontogeneia rostrata* (Amphipoda, Gammaridea) とが混ざったものである。採集後水洗・水切りしてポリ瓶に入れ、酵素の分離・精製用は -20°C で凍結して、また、セルラーゼ起源検索のための微生物培養試験用は氷冷して、それぞれ実験室に搬入した。供試までの間、前者は -20°C のフリーザー中に、後者は 4°C の冷蔵庫中にそれぞれ保存した。

酵素活性の測定

セルラーゼは、通常セルロースを分解する酵素群の総称で、従来 REESE の C_1-C_x 説⁴⁾に基づき、天然セルロースや濾紙、木綿糸など再生セルロースによく作用する C_1 酵素 (C_1) と、 C_1 によって活性化されたセルロースや水溶性のカルボキシメチルセルロース (CMC) などによく作用する C_x 酵素 (C_x) とに大別されていた⁵⁾。近年になって、 C_1-C_x 説は疑問がもたれて否定されているようで、現在のところセルラーゼとしては、CMC アーゼ (E. C. 3.2.1.4, C_x に相当すると考えられる) と β -D-グルコシダーゼ (E. C. 3.2.1.21) とアビセラゼ (E. C. 3.2.1.91, C_1 に相当すると考えられる) の3つの酵素が広く認められている^{6,7)}。しかし、本報告では、これまでの REESE の C_1-C_x 説に基づく C_1 活性と C_x 活性とを測定し、 β -D-グルコシターゼ活性は測定しなかった。

C_1 活性は、破碎濾紙法⁸⁾に従い、東洋濾紙 No. 51 特の0.5%破碎懸濁液を基質液として、モノード式振盪機 (大洋科学(株)製、振幅3cm, 60rpm) により振盪して3時間反応し、一方の C_x 活性は、CMC を基質する方法⁹⁾により、0.5% CMC 溶液中で30分間反応して、両者ともセルラーゼ作用によって遊離する還元糖を NELSON-SOMOGYI 法¹⁰⁾で測定した。セルラーゼ活性は、0.5%基質溶液中で1分間に $1\mu\text{g}$ のグルコースを遊離する活性を1酵素単位として便宜上酵素1ml 当りで表し、蛋白質1mg 当りに換算した値を比活性として表した。

蛋白質量の測定：ウシ血清蛋白質 (和光純薬製) を標準

蛋白質として、LOWRY らの方法¹¹⁾に従い、測定した。

酵素の精製

精製にあたって調べた酵素の安定性に留意して種々検討した結果に基づき、つぎのようにして部分精製した。
粗抽出液の調製：上記凍結試料を解凍後、乳鉢中で等量の海砂とともに摺りつぶし、3倍量の1%食塩水を加えて攪拌後、直ちに $3,000\times\text{g}$ 、10分間遠心分離して得られた上澄液を粗抽出液とした。

硫酸塩析：上記粗抽出液を硫酸塩析して30~70%硫酸飽和沈殿を集め、つぎの Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィー平衡化緩衝液の0.1M食塩を含む0.02M酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した。この画分を同緩衝液で1夜透析し、遠心分離して得た上澄液を硫酸塩析画分とした。

Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィー (第1回)：上記塩析画分を、限界濾過器 (東洋科学(株)製、濾過膜 UK-10 [現 Q 0100]、分画分子量10,000) で濃縮し、同上緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム ($2.5\times 93.3\text{cm}$) に試料液15ml (蛋白質：923mg, C_1 活性：465単位, C_x 活性：65,200単位) を注入して、流速 22.2ml/hr で溶出し、溶出液を 9.1ml ずつ分取した。酵素活性を有する画分を集めて Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィー画分とした。

DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィー：上記 Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィー画分を、限外濾過によって濃縮および緩衝液の交換を行い、その15ml (蛋白質：302mg, C_1 活性：358単位, C_x 活性：47,200単位) を0.05M酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム ($2.5\times 40\text{cm}$) に注入し、流速 31.1ml/hr でカラム平衡化と同一緩衝液250mlを流出後、濃度勾配 0.9mM/ml で2M食塩までの直線的濃度勾配溶出を行い、 10ml ずつ分取した。酵素活性を有する画分を集めて、DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィー画分とした。

Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィー (第2回)：上記 DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィー画分について、さきの Sephadex G-100 カラムを用い、試料注入量を 5.0ml (蛋白質：139mg, C_1 活性：294単位, C_x 活性：41,900単位)、分画量を 4.2ml として、再度ゲルクロマトグラフィーを行った。

なお、以上の精製操作はすべて 4°C の低温室中で行った。

分子の測定

Sephadex ゲルクロマトグラフィーによる分子量測定法¹²⁾により、その近似値を求めた。すなわち、上記 Sephadex G-100 ゲルカラムを用いたクロマトグラフィーによって得られた各標準蛋白質の比溶出液量 (V_e/V_0) とそれらの分子量の常用対数値との関係直線に、Gammarids セルラーゼの比溶出液量をプロットして近似的分子量を測定した。

セルロース分解菌の培養試験

Gammarids を滅菌海水で濾過器 (東洋濾紙 No. 2) を通して洗い出した洗浄液と、洗われた Gammarids と滅菌海水との無菌的ホモジネートとを培養原液とした。ついで、10倍希釈法により希釈液を Table 4 に示す 2 種類の培地に接種して、セルロース分解菌を 25°C で 1~3 カ月間培養した。セルロース分解菌の検出は、濾紙 (東洋濾紙 No. 51 特) の崩壊をもって同細菌陽性と判定し

結果および考察

酵素の精製

Gammarids 粗抽出液は、pH 5~6 で高い C_1 活性と C_x 活性を有し、ともに至適 pH を 5.5 付近に示した。そこで、Gammarids のセルラーゼ産生をより明確にするため、その分離・精製を試みた。

Sephadex G-100ゲルクロマトグラフィー (第 1 回) : 粗抽出液の 30~70% 硫酸塩析画分の Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィーの結果を Fig. 1 に示した。酵素活性は、 C_1 活性、 C_x 活性とも、pH 5.5 (0.05 M 酢酸緩衝液)、40°C で、 C_1 が 3 時間、 C_x では 30 分間反応して測定した。両活性および蛋白質量とも分画液 1 ml 当りの吸光度で表してある。これらの酵素活性の測定条件および表示法は、以下の各精製段階でも同じである。

この溶出曲線から分かるように、 C_1 活性と C_x 活性とはほぼ並行した溶出パターンを示し、分画 No. 40 付近を中心として大きな活性画分が得られた。この活性画

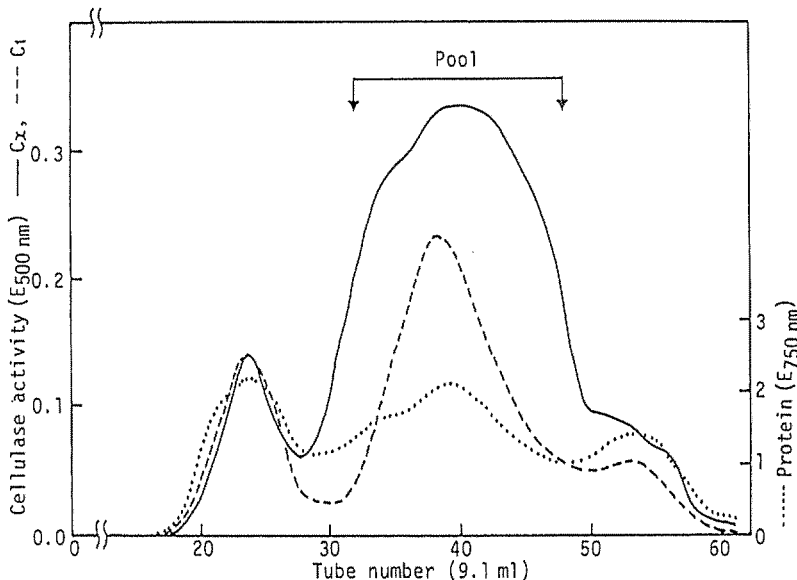


Fig. 1. First Sephadex G-100 gel filtration of the dialysate from ammonium sulfate fractionation.

The sample solution (15 ml, 465 units of C_1 -activity and 65,200 units of C_x -activity) was applied to the column (2.5×93.3 cm) and eluted with 0.02 M acetate buffer containing 0.1 M NaCl, pH 5.0, at a flow rate of 22.2 ml/hr. Contents in tube No. 32-48 were collected (First Sephadex G-100 fraction).

分の C_1 活性と C_x 活性とは曲線の様子がやや異なっており、ピークも幾分ずれている。したがって、濾紙と CMC に対する活性の割合の異なる、つまり、基質特異性の相違する2つあるいはそれ以上のセルラーゼの混在が窺われる。分画 No. 24 付近にも活性画分の溶出がみられるが、活性が量的に少ないわりに蛋白質量が大きくさほど重要でないと考え、この画分については以後検討しなかった。そこで、分画 No. 32~48 を集めた主活性画分をつぎの DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーに付した。

DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィー：粗分画された上記主活性画分の DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラムを Fig. 2 に示した。食塩濃度はモル法によって測定したが、食塩濃度 1.5 M 付近で溶出するセルラーゼ活性画分が分離された。セルラーゼ活性を示す溶出ピークがそれ一つだけであるのに対し、蛋白質の溶出ピークがいくつも現われている。それゆえ、この活性画

分は夾雑蛋白質がかなり除去されたもので、クロマトグラフィー的にもほぼ単一のピークとなっている。しかし、このピークを詳しくみると、 C_1 活性と C_x 活性とは一見並行して溶出しているようにみえても、はっきりとピークの分画 No. が1つずれていた。それゆえ、両活性が1つの酵素によるものでないことは明確である。そこで、この活性画分を再度さきの Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィーに付してさらに精製した。

Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィー (第2回)：第2回目の Sephadex G-100 ゲルクロマトグラムを Fig. 3 に示した。試料添加量を前回の1/3、分画量を1/2弱として実施したが、 C_1 活性と C_x 活性とはピークの溶出位置が明らかに異なっているものの2つの画分に分かれず、溶出曲線はたがいに重なり合っている。しかし、分画 No. 69 付近で肩状となってかなりの夾雑蛋白質の除去ができ、一層の精製がなされた。本研究では、この段階で一応、精製の目標に達したと考えて、これ以上の分

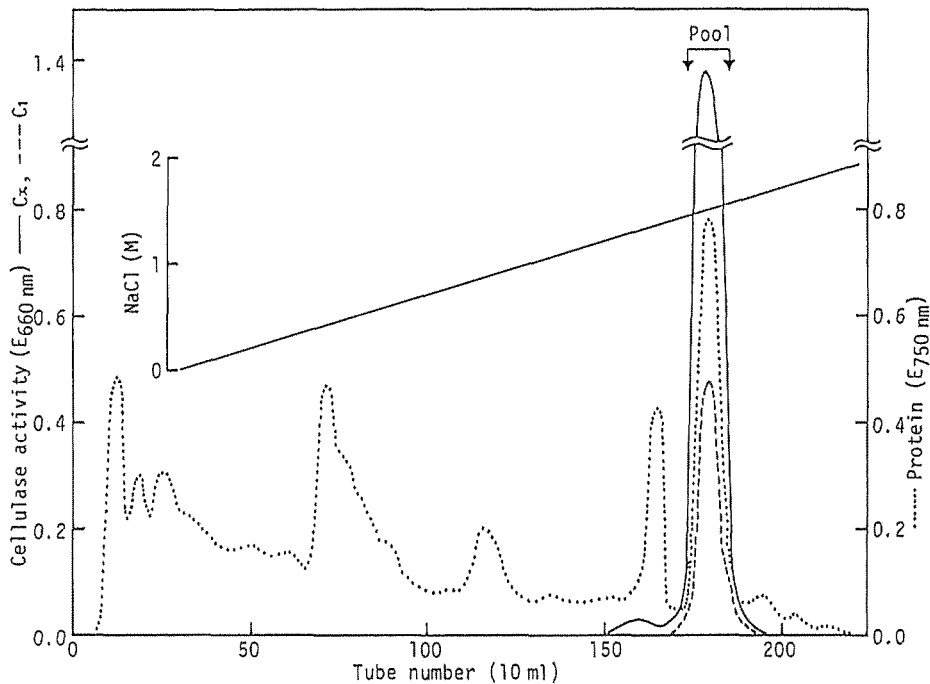


Fig. 2. DEAE-Sephadex A-50 chromatography of first Sephadex G-100 fraction.

First Sephadex G-100 fraction (358 units of C_1 -activity and 47,200 units of C_x -activity) was loaded to a column (2.5×40 cm) and eluted with a continuous linear gradient elution of NaCl in 0.05 M acetate buffer, pH 5.0, after let flowing 250 ml of the same buffer at a flow of 31.1 ml/hr. Contents in tube No. 174-186 were collected (DEAE-Sephadex A-50 fraction).

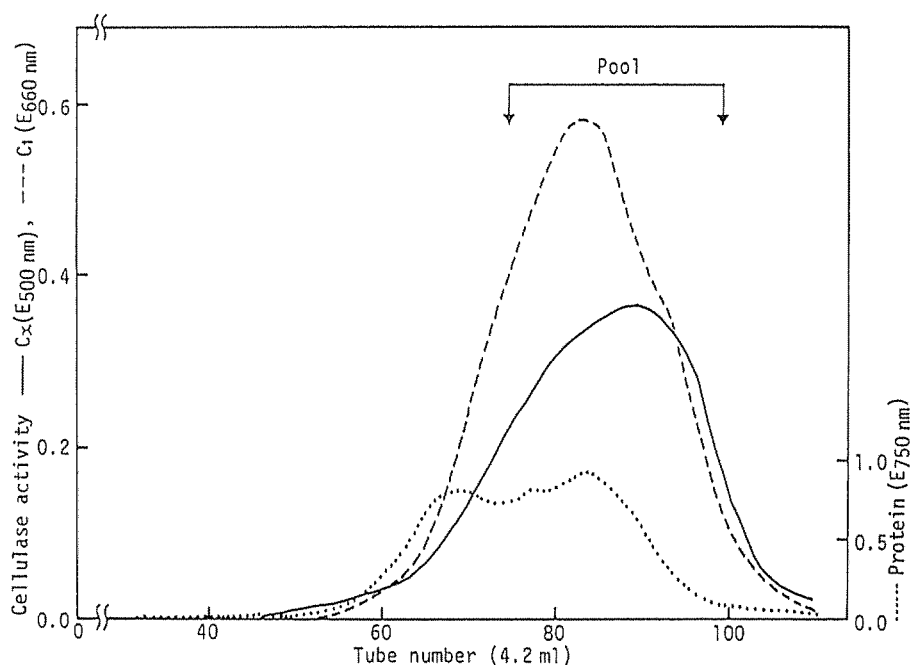


Fig. 3. Secondary Sephadex G-100 gel filtration of DEAE-Sephadex A-50 fraction.

Five milliliters of DEAE-Sephadex A-50 fraction (C_1 - and C_x -activities; 294 and 41,900 units) was loaded to column (2.5×93.3 cm). The flow rate was 23.1 ml/hr and the fraction size was 4.2 ml.

離・精製は行わなかった。そこで、分画 No. 75~100 を集め、限外濾過して濃縮し、緩衝液を除去後 1% 食塩水に交換して Gammarids セルラーゼの部分精製画分とし、以後の実験に供した。

種々のクロマトグラフィーで部分精製されたセルラーゼ画分の比活性、精製比および収量を Table 1 に示す。精製原料の粗抽出液に対して、 C_1 活性が 125 倍に、 C_x 活性では 65.3 倍に精製され、収量はそれぞれ 12% と 6.2% であった。因に、本部分精製セルラーゼ画分を市販セルラーゼ標品と活性の比較をすると Table 2 のようである。比較例は 3 例と少ないが、 C_x 活性の高い *Aspergillus niger* のものは典型的な C_x 酵素であり、また、 C_1 活性の比率が高い *Torichoderma viride* のものは代表的な C_1 酵素である。Gammarids セルラーゼは部分精製段階のものでも、 C_1 活性はいずれの酵素に比べてもほぼ 1/2 で、 C_x 活性では *T. viride* セルラーゼに比べると約 3 倍もあるが、*A. niger* セルラーゼの約 1/4 しかない。この C_1 活性と C_x 活性との比率からも、部分精製酵素

画分に C_1 酵素と C_x 酵素の混在が窺い知れる。

部分精製酵素の性質

部分精製セルラーゼについて、酵素反応の至適 pH および至適温度、酵素の pH 安定性および熱安定性並びに分子量などを調べた。

至適 pH と至適温度：酵素活性と pH および温度との関係を Fig. 4 に示す。至適 pH の検討は、各 pH (0.2 M 酢酸緩衝液)、30°C で、 C_1 活性が 1 時間反応で、 C_x 活性が 30 分間反応でそれぞれ行った。両 pH-活性曲線はほぼ同様のパターンを示して、部分精製酵素の C_1 活性、 C_x 活性の至適 pH はともに pH 5.5 付近にあった。菌類セルラーゼの至適 pH は 4.5~6.0 にあって、*T. viride* や *A. niger* ではともに pH 4.5 付近にあるが^{8,13-18)}、これらに比べて Gammarids のセルラーゼは pH 値が 1 高く、中性により近いところでよく作用する。

一方の温度-活性曲線は、至適 pH の 5.5 で、 C_1 活性が 3 時間、 C_x 活性では 30 分間それぞれ反応した場合で

Table 1. Purification of gammarids cellulase

Purification step	Total protein (mg)	C ₁ -activity				C _x -activity			
		Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
1% NaCl extract	26,800	1,320	0.0492	1	100	213,000	7.95	1	100
30-70% satn. SO ₄ (NH ₄) ₂ precipitate (dialyzed)	923	465	0.503	10.2	35.2	65,200	70.6	8.9	30.6
Sephadex G-100 gel filtration (first)	302	358	1.18	24.0	27.1	47,200	156	19.6	22.1
DEAE-Sephadex A-50 chromatography	139	294	2.11	42.9	22.3	41,900	301	37.9	19.7
Sephadex G-100 gel filtration (second)	25.6	158	6.17	125	12.0	13,300	519	65.3	6.2

Table 2. Comparison of activities of gammarids cellulase with those of three commercial cellulases

Cellulase Preparation	Activity (μg glucose/min/mg protein)	
	C ₁	C _x
Cellulase "Amano T"* ¹ (<i>Trichoderma viride</i>)	12.7	222
Cellulase* ² (<i>Trichoderma viride</i>)	14.7	176
Cellulase "Amano A"* ¹ (<i>Aspergillus niger</i>)	14.8	1,970
Cellulase (Gammarids)	6.17	519

*¹ Amano Seiyaku Co.-made products.

*² E. Merch A. G.-made product.

Each enzyme activity was determined under optimal condition (pH 5.0, 40°C), but reaction pH of only gammarids cellulase was 5.5. Incubation times of C₁ and C_x were for 3 hours and 30 minutes, respectively.

ある。C₁ 活性の 3 時間反応における至適温度は 40°C 付近にあり、C_x 活性では反応時間が短いこともあって、45°C でも 40°C とほとんど変わらない活性を示し、30 分間反応での至適温度は 40°C と 45°C の間にあった。*T. viride* や *A. niger* のセルラーゼの至適温度は、C₁ 活性では 40~50°C でよく作用して 45°C 付近にあり、C_x 活性では 60°C 付近にある^{8,13-18})。Gammarids セルラーゼは、その生息環境水温から予測されたように、それらに比べて比較的低い温度でよく作用することが判明した。

pH 安定性と熱安定性：酵素の pH および熱安定曲線を

Fig. 5 に示す。pH 安定性は、酵素を pH 4~10 (pH 4~6 : 0.2 M 酢酸緩衝液, pH 6~8 : 0.2 M リン酸緩衝液, pH 8~10 : 0.2 M ホウ酸緩衝液) で、30°C に 20 時間保って調べた。C₁、C_x 活性とも pH 5~8 で比較的安定で、pH 7.0 では 100% の活性が保たれた。この安定領域は、*T. viride* や *A. niger* のものの pH 4~6^{14,15,19}) に比べてやや広くて高い pH 域にあり、至適 pH での両者の関係とよく符合している。しかし、この安定領域を外れると急激に失活した。一方、熱に対しては、最安定 pH の 7.0 で 30 分間加温して検討したが、C₁、C_x 活性ともよく似た傾向を示し、いずれも 40°C 付近まではまったく安定である。しかし、45°C を越えると温熱による酵素の急激な破壊が起り、急激な失活が 60°C 以上でみられる *T. viride* や *A. niger* のもの^{14,15,19}) に比べて、Gammarids のセルラーゼは熱に対してやや不安定である。分子量：さきの第 2 回目の Sephadex G-100 ゲルクロマトグラフィーにおける C₁ 活性と C_x 活性の溶出ピークに、両酵素の互いの影響と混在する β-D-グルコシダーゼの影響なども考えられるが、両活性ピークがそれぞれの酵素の溶出位置と考えると、両酵素の分子量の概略値を求めた。なお、両酵素の Sephadex ゲルへの吸着による溶出の遅れは、溶出パターンからみてほとんどなかったものと考えられる。Fig. 6 はさきの精製のときと同一カラムに標準蛋白質を付して得られた結果である。この図から、C₁ 活性を示す酵素の分子量が約 34,000 で、C_x 活性を示す酵素は約 26,000 と推定された。OKADA^{14,15}) が高度に精製した *T. viride* のセルラーゼ II-A, II-B および III はそれぞれ 30,000, 43,000 および 45,000 の分子量

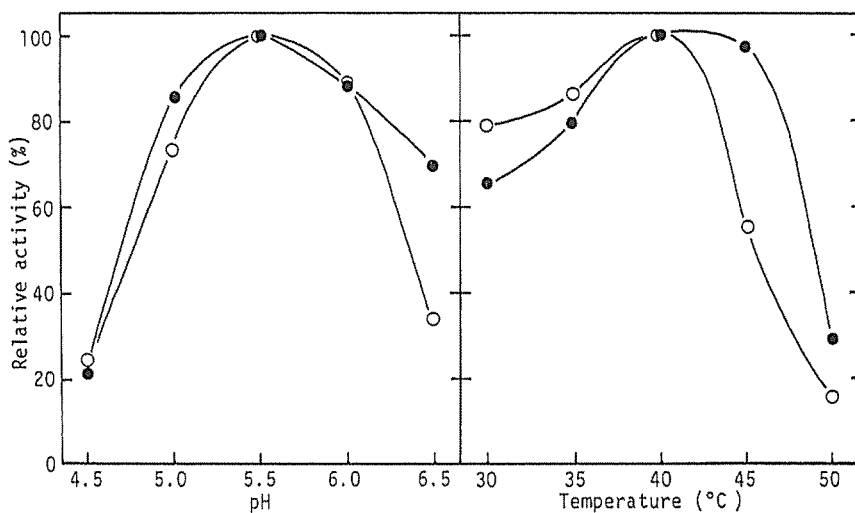


Fig. 4. Effects of pH and temperature on the C₁- and C_x- activities of partial purified gammarids cellulase.

The enzyme assays in the pH-activity curves were carried out at various pHs in 0.05 M acetate buffer and at 30°C, while those in the temperature-activity curves at various temperatures and optimal pH 5.5. The incubation times in those assays were for 3 hours on C₁-activity and 30 minutes on C_x-activity.

○—○: C₁-activity, ●—●: C_x-activity

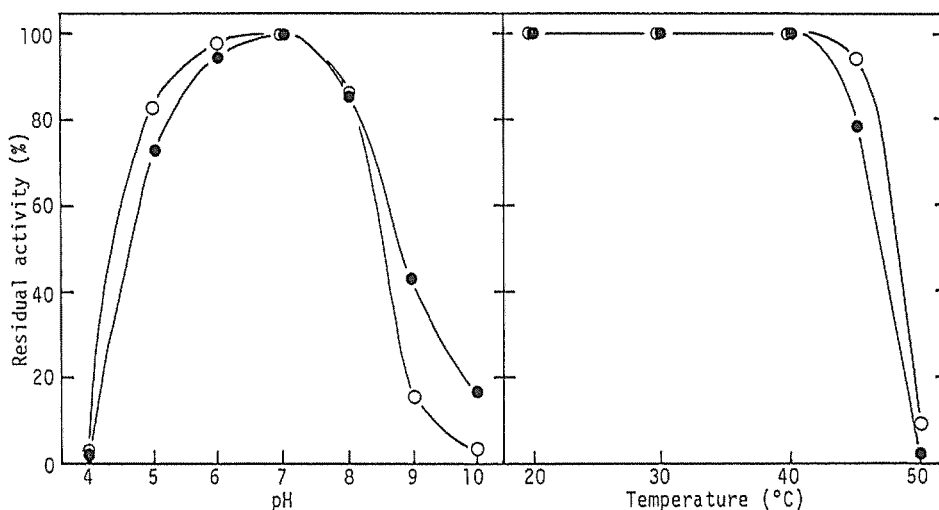


Fig. 5. Effects of pH and temperature on the stability of partial purified gammarids cellulase.

In the pH-stability curves, the enzyme was incubated at various pHs (pH 4–6: 0.2 M acetate buffer, pH 6–8: 0.2 M phosphate buffer, pH 8–10: 0.2 M borate buffer) for 20 hours at 30°C. The residual activity was assayed at pH 5.5 and 30°C, for 3 hours upon C₁-activity and 30 minutes upon C_x-activity. On the other hand, in the thermal stability curve the enzyme was incubated at various temperatures for 30 minutes at pH 7.0, then residual activity was assayed.

Symbols are the same as those in Fig. 4.

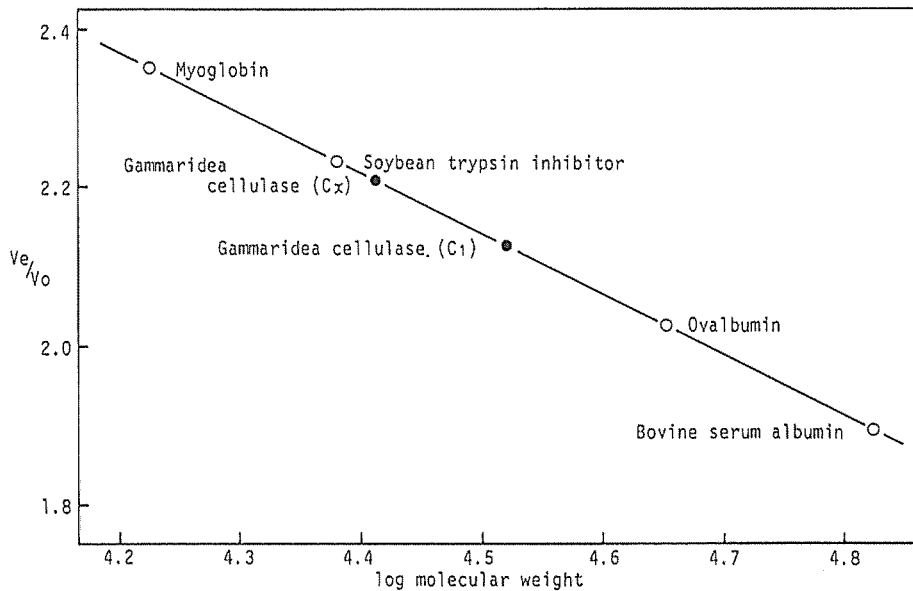


Fig. 6. Determination of the proximate molecular weight of partial purified gammarids cellulase by the column gel filtration on Sephadex G-100.

をもつが、Gammarids のセルラーゼは *T. viride* のセルラーゼ II-A とほぼ似た分子量をもったものと思われる。

セルロース分解菌の培養試験

上記のように、Gammarids からセルラーゼの分離・精製を試みて、部分精製酵素画分を得ることができ、その若干の性質も判明した。しかし、そのセルラーゼが Gammarids 起源のものか、それとも Gammarids の体表

に付着するか体内に生息する微生物によるものか、その由来を究明するため、セルロース分解菌の培養試験を行った。Table 3 に示したように、Gammarids の洗浄液、ホモジネートとも 3 カ月を過ぎても濾紙の崩壊がみられなかった。嫌気性菌については検討していないが、本結果から、Gammarids の体表あるいは体内にセルロース分解菌は付着あるいは生息していないと判断される。そ

Table 3. Cultivation test of cellulolytic bacteria from gammarids^{*1}

	Homogenate (cells/g)	Washed water (cells/ml)
Bacteria	2.6×10^6	1.0×10^4
Cellulolytic bacteria		
Medium I ^{*2}	ND ^{*3}	ND ^{*4}
Medium II ^{*2}	ND ^{*3}	ND ^{*4}

*1 Gammarids (3.486 g wet) were washed with 380 ml of sterile sea water.

*2 Cultured for 3 months at 25 °C.

*3 Not detected (less than 1.1×10^0 cells per 1 g of wet gammarids).

*4 Not detected (less than 0.2 cells per 1 ml of washed water).

Table 4. Composition of media for cellulolytic bacteria

	Medium I	Medium II
Yeast extract	1.0 g	Polypeptone 1.0 g
KNO ₃	2.6 g	Yeast extract 0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g	City water 100 ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g	Sea water 900 ml
NaCl	30.0 g	Filter paper ^{*1} 1×10 cm
KCl	0.7 g	
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.8 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.4 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0 g	
Distilled water	1,000 ml	
Filter paper ^{*1}	1×10 cm	

*1 Toyo No.51 special.

れゆえ, Gammarids から得られた C_1 活性, C_x 活性を示すセルラーゼは Gammarids 自身に由来したものであって, 藻場に生息する Gammarids にセルラーゼが存在することが推定された。

文 献

- 1) HALCROW, K. Cellulase activity *Gammarus oceanicus segerstrale* (Amphipoda), *Crustaceana*, **20**: 121-124 (1969).
- 2) MONK, D. C. The digestion of cellulase and other dietary components, and pH of the gut in the amphipod *Gammarus pulex* (L.), *Freshwat. Biol.*, **7**: 431-440 (1977).
- 3) HARRISON, P. G. and K. H. MANN. Chemical Changes During the Seasonal Cycle of Growth and Decay in Eelgrass (*Zostera marina*) on the Atlantic Coast of Canada. *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**: 615-621 (1975).
- 4) LEESE, E. T., R. G. H. SUI and H. S. LEVINSON. The biological degradation of soluble cellulose derivative and its relationship to mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.*, **59**: 485-497 (1950).
- 5) 相沢高亮. セルラーゼ. 酵素利用ハンドブック (小崎道雄監修, 地人書館), p. 243-246 (1980).
- 6) 岡田巖太郎, 田中義正. セルラーゼ——天然セルロースの酵素的分解機構. 澱粉科学, **35** (4): 253-277 (1988).
- 7) 村尾沢夫, 荒井基夫, 阪本禮一郎. セルラーゼ. (講談社), p. 15-19 (1987).
- 8) 千葉悟郎, 葛西 博. トリコデルマ・セルラーゼの破碎濾紙を用いての酵素力測定法とその意義. 食品工業, **5** (16): 34-37 (1962).
- 9) 松葉 豊, 小巻利章. CMC を基質とするセルラーゼの1力価測定法. 食品工業, **5** (16): 22-24 (1962).
- 10) SOMOGYI, M. Note on suger determination. *J. Biol. Chem.*, **195**: 19-23 (1952).
- 11) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL. Protein mesurement with the FOLIN phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265- 275 (1951).
- 12) WHITAKER, J. R. Determination of weights of proteins gel filtration on Sepadex. *Anal. Chem.*, **35**: 1950-1953 (1963).
- 13) 岡田巖太郎. 酵素ハンドブック (丸尾文治, 田宮信雄監修, 朝倉書店), p. 495 (1982).
- 14) OKADA, G. Enzymatic Studies on a Cellulase System of *Trichoderma viride*. II. Puification and Properties of two Cellulases. *J. Biochem.*, **77**: 33- 42 (1975).
- 15) OKADA, G. Enzymatic Studies on a Cellulase System of *Trichoderma viride*. IV. Puification and Properties of Less-Random Type Cellulase. *J. Biochem.*, **80**: 913-922 (1976).
- 16) 西澤一俊. セルラーゼ. 南江堂, p. 36 (1974).
- 17) 西澤一俊. セルラーゼ. 南江堂, p. 43 (1974).
- 18) 相沢高亮. セルラーゼ. 酵素利用ハンドブック. (小崎道雄監修, 地人書館), p. 247 (1980).
- 19) 辻坂好夫監訳. 酵素工学ハンドブック. (WISEMAN, A. 編, 講談社), p. 178 (1977).