

ボタнтаケ菌群のセルラーゼについて (2)

土居則子・山口順子・倉田宣威

On the cellulases of the genus *Hypocrea* and its allies (2)

Noriko DOI, Junko YAMAGUCHI and Nobutake KURATA

The cellulolytic activity on filter paper so-called “C₂” of two *Hypocrea* species, *H. nigricans* (Imai) Doi (strain number D-47) and *H. peltata* (Jungh.) Sacc. (strain number D-240) were assayed by the method of Kitamikado and Toyama.

1. C₂ activities of the strains of two species varied in accordance with the incubation periods. Both strains had strong activities in the time when their hyphae had covered the whole media.

2. C₂ activities were increased by adding some salts to “Husuma” culture media.

3. There was little difference of C₂ activities among the materials by three drying methods: natural drying, acetone treating and freeze-drying.

4. C₂ activities of the same materials varied in accordance with the extracting times and temperature. The optimum extracting time was about 2 hours and the optimum temperature was 20-30°C.

5. Relative activities of unknown strains were considered to be valid only when they compared with those of well-known criteric strains in the same assay.

6. Relative activities of C₂ in the genus *Hypocrea* can be useful as a taxonomic characteristic by above-mentioned method.

前回の報告¹⁾では、12種のボタнтаケ (*Hypocrea*) 属に由来するトリコデルマなどの不完全菌の沓紙崩壊酵素活性を定量的に測定し、その結果、ボタнтаケ菌群は一般に強い沓紙崩壊能力をもつこと、また、セファロsporiumやヴァーティシリウムや、あるいは分生子を形成しない種でも、ボタнтаケ属に由来する不完全菌であれば一般に沓紙崩壊力が強かったことを報告した。今回は前回の測定の結果、特に沓紙崩壊能力の強かった *Hypocrea nigricans* (Imai) Doi (TNS. D-47株) に由来するトリコデルマを主材料として、これに *H. peltata* (Jungh.) Sacc. (TNS. D-240株) を加えて、培養期間の長さ、麩培地への塩の添加、培養後の麩麩の処理方法などによる C₂ の相対的な活性を比較し、また振盪装置の個体差や菌の接種・生育の状況による測定値の変動についても考察した。また、それらの資料に基いて、C₂ の定量的測定方法の妥当性および分類学的形質としての適性などを考察した。

菌の培養期間の長さによるセルラーゼ量の消長については、外山²⁾は、*Trichoderma Koningii* の1菌株では、今回筆者らの用いた方法とは別の培養方法によって測定した結果、培養を始めて13-23日の間がセルロース分解力が強かったと報告した。また、外山による麩を用いた、今回筆者らが

採用している培養方法によって、外山ら⁸⁾が *T. viride* について測定した結果では、培養を始めて3—4日ですでに活性が強かったと報告した。土居ら¹⁾は、*Hypocrea nigicans*の3株についても、3—4日目ですでに活性が強いと報告した。小川・外山⁹⁾は、さらに、麩を用いた同様の培養方法による *T. viride* のセルラーゼの各構成成分ごとの活性の消長を測定し、沓紙崩壊能力 (C_2) は、他のセルラーゼ成分としてのガーゼ崩壊力 (C_{1g})、Avicel分解力 (C_{1a})、CMC分解力 (C_3) などの活性の強さとは無関係に、培養期間3—4日で活性が最も強くなり、それ以後は減退するがそれに反して他の成分は比較的長期にわたって活性を持続したと報告した。

培養温度の影響については、外山⁹⁾は *T. viride* について25°—30°Cが好適であったと報告している。今回は温度による差異については省略した。

次に培地の組成については、外山⁹⁾は、通常の寒天培地では、麩エキスを加えることによって活性を強くすることができたこと、また、外山⁹⁾は、麩培地の場合は、適当な塩類を添加することによって C_2 活性を強くすることができたことを報告した。

次に、麩で培養した後の乾燥処理方法については、外山⁹⁾は、通常、麩を風乾して用い、岩崎⁷⁾はアセトンで処理して用いた。酵素の性質によっては、これらの方法の違いによる差が表われることも考えられるので、筆者らは今回、蛇足ながら真空凍結乾燥処理をも比較した。また、乾燥した麩麩からの C_2 の抽出時間、抽出温度による活性の差については従来はあまり測定されていないが、今回はそれらも測定してみた。

また、使用する振盪装置による沓紙崩壊時間の差も考えられるので、同一試料を異った2機により測定し比較した。またその測定結果から、麩培地に接種する際の不均等性もばらつきに対して要因になっているのではないかと、との疑いが出てきたので、それらのことを測定値の安定性の問題点として考察した。沓紙の性質による崩壊時間の差は、北御門・外山⁹⁾によって詳しく測定されている。今回は省略した。なお、外山・北御門の方法による測定値のばらつきの問題については、松葉ら⁹⁾の報告がある。

実験の部

測定に際して、主な培養方法、測定方法などは前回の報告¹⁾に準じた。ただし、振盪装置を2セット使用したこと、培養温度を前回より厳密に〔目標温度 $\pm 1^\circ\text{C}$ 〕以内に制御したこと、麩や沓紙が同規格ながら別個体であることなどにより、後に考察でふれるように崩壊所要時間そのものとしては前回と今回の数値の間には相対的にずれているものがある。

1, 2菌株の沓紙崩壊活性の培養期間による消長

培養には、同質の麩、蒸溜水、試薬、ガラス容器などを用いて同時に同一培養室で行ない、肉眼的にどのフラスコにもほぼ同様に菌糸が広がるのを確かめた上で、それらのフラスコから無作為に麩+蒸溜水のものと同様に無機塩水入りのフラスコを各々1個づつとり出し、すぐに乾燥(40°C $\pm 2^\circ\text{C}$ の乾燥器内に約18時間放置)を行い、それをデシケータ中に保管し、最も長く培養した試料の乾燥を完了した時点で、全試料を一斉に抽出処理し、測定した。その結果を表1に示した。沓紙の崩壊の程度の表示は前回の報告¹⁾に準じ、L型管5本づつの結果の平均値のみ示した。無記入欄は完全に崩壊したことを示す。

表1によると、供試2菌株は、培養期間の長さによって活性が明らかに消長した。この活性の消長を麩培地上での菌糸の発育の程度と対応させると、*H. peltata*は*H. nigricans*より生長がはるかに遅いが、沓紙崩壊活性が最も強かった時期は、両菌株共に菌糸が麩のほぼ全面に広がった時期か

ら、分生孢子が麩の全面に発生するまで (*H. nigricans*) および空中菌糸が十分密になるまで (*H. peltata*の場合) の期間であった。その後は、活性は低下してゆくが、この時期の菌糸は、原形質がほとんど消失し、うすい細胞膜が残り、その菌糸のところどころに厚膜孢子が形成されていたり、微小原形質粒を残している状態で、自溶現象が予想された。このような菌糸がセルラーゼ生産力をもつとは考えられない状態であった。以上の結果に基いて、今後のC₂の定量的な測定には、上述のようなC₂活性の最も強い時期に相応する菌糸の生育状態で処理測定する必要のあることがわかった。また表1によると、上述のような期間内でも活性がいく分は変動することがあるので、測定用試料を複数個扱うか、または、菌糸が麩の全面に広がった時点、分生孢子が盛んに形成され、あるいは菌糸が活発に密になってゆく時点、および十分に生長した時点の3時点の試料について測定

表1, *Hypocrea nigricans* および *H. peltata* の沱紙崩壊活性の
培養期間による消長および麩培地に添加する塩類による影響

菌株	塩類の添加	培養日数	作用時間 (分)										麩培地の表面での菌糸・分生孢子の消長				
			15	30	45	60	75	90	105	120	135	150					
<i>Hypocrea nigricans</i> (TNS・D-47)	無	4	—	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	菌糸がほぼ全面に広がる。	
		6	—	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±	分生子がほぼ全面に発生。		
		8	—	—	±	+	+	±	±	±	±	±	±	±	これ以上生長する余地なし。		
		11	—	±	±	+	+	+	+	±	±	±	±	} 麩は水っぽくなり、表面の菌糸が消え始める。			
		14	—	—	±	±	±	+	+	+	+	+	+				
		加	20	—	—	—	±	±	+	+	+	+	+	+	} 菌糸は次第に見えにくくなる。		
			25	—	—	—	—	±	±	±	±	±	±	+			
			30	—	—	—	—	±	±	±	±	±	±	+			
			35	—	—	—	—	—	—	±	±	±	±	±			
			40	—	—	—	—	—	—	±	±	±	±	±			
	添		4	—	±	±	+	±	±	±	±	±	±	±		±	菌糸がほぼ全面に広がる。
			6	—	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±		±	分生子がほぼ全面に発生。
			8	—	—	±	+	±	±	±	±	±	±	±		±	} 菌糸がさらに密になる。
			11	—	±	+	+	±	±	±	±	±	±	±			
			14	—	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±		±	} 麩は少し水っぽくなり、表面の菌糸が見えにくくなる。
		20	—	—	±	±	±	±	+	+	+	+	±				
		加	25	—	—	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	} 綿状空中菌糸が所々で発生する。	
			30	—	±	+	+	+	±	±	±	±	±	±			
			35	—	±	±	+	+	±	±	±	±	±	±	±		
			40	—	—	—	—	±	±	±	±	±	+	+	+	菌糸はいくらか見えにくくなる。	

Hypocrea peltata (TNS・D-240)	無 添 加	5	-	-	-	-	±	±	+	+	+	菌糸が至る所で広がる。	
		7	-	±	±	+	+	±	±	±	±	菌糸がほぼ全面をおおう。	
		9	-	±	+	+	±	±	±	±	±	菌糸が密になる。	
		12	-	±	+	±	±	±	±	±	±	} 菌糸がさらに密になる。	
		15	-	±	+	±	±	±	±	±	±		
		21	-	-	±	+	+	+	+	±	±	±	これ以上生長する余地なし。
		26	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	} 菌糸が次第にしおれたようになり、見えにくくなる。
		31	-	-	-	-	±	±	±	±	+	+	
		36	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	
	41	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±		
	添 加	5	-	-	-	-	±	±	+	+	+	±	菌糸が至る所で広がる。
		7	-	±	+	±	±	±					菌糸がほぼ全面に広がる。
		9	-	±	+	±	±	±	±				菌糸が密になる。
		12	-	±	+	±	±	±					菌糸がさらに密になる。
		15	-	±	+	±	±	±	±	±			菌糸がさらに密になる。
		21	-	±	+	+	+	±	±	±	±	±	これ以上生長の余地なし。
		26	-	-	-	±	±	±	±	±	+	+	} 菌糸が次第に見えにくくなるが、ときどき綿毛状の空中菌糸のコロニーが散発する。
		31	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	
		36	-	-	-	-	-	±	±	±	+	+	
41	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±			

(備考) 培養温度は25°C ± 1°C

し、その中で最も活性の強いときの値をその種（または株）の沓紙崩壊能力として選ぶのが適当だと考えられる。

2. 黴培地に塩類を添加した場合と添加しない場合のC₂活性の強さの比較

外山⁵⁾による無機塩類添加の処方は次のとおりである。

2 N・HCl	100ml
ZnSO ₄ ・7 H ₂ O (0.62%溶液)	10ml
FeSO ₄ ・7 H ₂ O (0.63%溶液)	10ml
CuSO ₄ ・5 H ₂ O (0.08%溶液)	10ml
MnSO ₄ ・7 H ₂ O (0.63%溶液)	10ml

以上を水道水で1lにする。

ただし、今回の培養に際しては、水道水のかわりに蒸留水を用い、また黴培地に鋸屑を混入しな

かった。上記組成の塩類を麩10gについて12mlづつ加えた。以上の処方による培養によって得られた沝紙崩壊活性(C₂)の測定結果は、表1のとうりである。表1によると、両菌株共に、塩を加えた方がはるかに沝紙崩壊力が強く、かつ、より長期間にわたって活性が持続した。この結果により、今後のポタンタケ菌群のC₂活性の定量的比較に際しては、塩類を加えた麩培地を用いる方が、強い安定した活性が測定できることがわかった。

3. 培養後の麩麩の処理方法による測定値の差異の吟味

(i) 乾燥処理について

酵素の性質によっては、熱に弱かったり、また、粗酵素(液)の状態では他の蛋白分解酵素などの働きで失活したりする場合もありうると考えられる。一方、セルラーゼのような菌体外酵素が、野外で十分に活性を発揮するためには、常温で大気成分や、他の化学物質で簡単に失活することは考えられない面もある。以上のような酵素活性の低下の可能性を一応吟味しておく目的で麩培養試料の乾燥に関して次の3方法を採用し、それらの間で測定値に有意の差がみられるかどうかを吟味した。

風乾：約40°Cの乾燥器内に約18時間放置したのち、デシケーターで保存した。

アセトン処理：培養試料の入ったフラスコに冷アセトンを加え、よく攪拌して沝液を流し去る操作を3回くり返し行ったのち、試料を板ガラス上に広げて室温でアセトンを揮発させた。この試料をデシケーターで保存した。

真空凍結乾燥：通常の真空凍結乾燥機を用い通常の方法で乾燥させ、その試料をデシケーターで保存した。

表2はその結果である。表2によると、上記3処理方法による試料のC₂活性の定量的測定値には有意の差が認められなかった。この結果により、ポタンタケ菌群における沝紙崩壊能力の定量的測定に際しては、分類学的形質としての活性の強さを比較することが目的の場合は、最も簡単な風乾処理だけを採用すれば十分であることがわかった。

(ii) C₂酵素の抽出時間について

表3は麩培地に塩類を加え、25°C±3°Cで培養したD-47株の水抽出温度(27°C)を用いての抽出時間による沝紙崩壊所要時間の消長である。この表によると、抽出時間が10—180分の間で著しい差はないが、120分で最強であった。従って、今後の抽出は約2時間程度をかけて行うのが望ましいことがわかった。

(iii) C₂酵素の抽出温度について

表4は、(ii)と同様の培養方法により測定した結果である。表4によると、20°—30°Cで最もよく崩壊した。従って今後の測定には、20°—30°Cで抽出するのが適当であることがわかった。

4. 異なった振盪装置による沝紙崩壊所要時間の差異

Monod式恒温振盪装置A(規格No. OT-MO-20)およびB(No. OT-MO-30T)の2セットを同一振幅同一振盪回数に調整して同一試料(メイセラゼ1%溶液, 2%溶液を使用)について沝紙崩壊所要時間を測定した結果を表5に示した。これによると、振盪装置Aの方が崩壊が早く、特に崩壊の初期中期までの段階で明瞭な差が出た。従って異なった機種振盪装置を用いる場合は、振幅振盪回数などを同調しても、所要時間の絶対値には差の出ることが一般であることが考えられる。ただし、相対的な位置関係には差が出ないので、相対活性を測定の目的とする方法を用いれば、この測定方法は十分有意であると考えられる。

表2 培養数の処理方法による沱紙崩壊活性の定量的比較

菌株	塩類の添加	培養日数	処理方法	作用時間 (分)									麩培地の表面での菌糸分生胞子の消長			
				15	30	45	60	75	90	105	120	135		150		
Hypocrea nigricans (TNS・D-47)	無添加	4	風乾	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	菌糸が全面に広がる。
			アセトン	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			凍結乾燥	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		7	風乾	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	分生胞子が全面に発生し終る。
			アセトン	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			凍結乾燥	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	添加	4	風乾	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	菌糸が全面に広がる。
			アセトン	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			凍結乾燥	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		7	風乾	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	分生胞子が全面に発生し終る。
			アセトン	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			凍結乾燥	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hypocrea peltata (TNS・D-240)	無添加	10	風乾	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	菌糸が全面に広がる。	
			アセトン	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
			凍結乾燥	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		12	風乾	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	菌糸が密になる。
			アセトン	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			凍結乾燥	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	添加	10	風乾	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	菌糸が全面に広がる。	
			アセトン	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
			凍結乾燥	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		12	風乾	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	菌糸が密になる。
			アセトン	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			凍結乾燥	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

(備考) 培養温度 25°C ± 1°C

表3. 抽出時間による沱紙崩壊活性の消長

菌株	塩類の 添 加	培養 日数	抽出温度(°C)	作 用 時 間 (分)									
				15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Hypocrea nigricans (TNS・D-47)	添 加	6	10	-	±	±	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
			20	-	±	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥		
			30	-	±	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥		
			40	-	-	±	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	

表4. 抽出温度による沱紙崩壊活性の消長

菌株	塩類の 添 加	培養 日数	抽出時間(分)	作 用 時 間 (分)									
				15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
Hypocrea nigricans (TNS・D-47)	添 加	6	10	-	-	±	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
			30	-	-	±	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥
			60	-	-	±	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	
			120	-	-	±	+	⊥	⊥	⊥	⊥		
			180	-	-	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥	

表5. 測定用振盪装置の違いによる沱紙崩壊活性の比較

振盪装置	試 料	作 用 時 間 (分)									
		15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
A	メイセラーゼ-P 1 %	-	-	+	⊥	⊥	⊥	⊥	⊥		
	2 %	-	±	⊥	⊥	⊥					
B	1 %	-	-	±	+	+	⊥	⊥	⊥	⊥	
	2 %	-	±	+	⊥	⊥	⊥				

考 察

1. 供試2菌株の沍紙崩壊力は、ある一定期間をこえて培養を続けると次第に低下してゆく現象が認められたが、この原因については、今後、生成糖などが阻害するという説¹⁰⁾や、自溶作用があるらしいことなどをも考慮する必要がある。また、野外におけるセルラーゼ活性の変動とも関連づけて研究する必要もあろうと考えられる。特に、トリコデルマ属菌は、培地上だけでなく、野外においても、他の不完全菌類より急速に生長し、急速に分生子を形成し、その直後から急速に菌糸が消滅する現象が観察される。これらの現象と、沍紙崩壊活性をも含めてのトリコデルマの加水分解酵素系の活性の消長の特性とは、無関係ではありえないと考えられる。

2. 前回の報告¹⁾における沍紙崩壊活性の測定値と、今回の測定結果とを比較してみると、同じ菌株で同様の培養・測定方法を行ったにもかかわらず、沍紙崩壊所要時間にかんがりのずれが認められる。これは、培養に用いた麩の性質、振盪装置の機種、崩壊させる沍紙の個体差などによって、常に起りうることであると考えられる。さらには、菌株の麩上への接種方法も、安定した菌糸の拡散・生育を妨げている重要な要因ではないかと考えられる。異った研究者が、異った器械を用いて測定した結果については、測定した絶対数値間の比較は、それ故無意味である。従って、今回採用したような測定方法における測定の目的としては、特定の器械や培養材料による測定値そのものでなく、できるかぎり器械の特性や培養材料を精密に指定しながらも、菌株間の相対的な活性の強さの位置関係を測定の目的としなければならないと考えられる。そのような相対活性、つまり種間や菌株間の崩壊活性のパターンや強さの相対的な位置関係についてみれば、前回と今回の測定結果間にも矛盾はないことがわかる。以上のようなことから、今後のボタンタケ菌群の種間、株間の沍紙崩壊活性の定量的比較に際しては、十分に活性の強い既知の菌株を比較基準として用いるならば、定量的測定値の基準菌株との相対的位置関係に関するかぎり、十分再現性があると考えられる。そしてその範囲内の相対活性は、分類学上有意の形質として認めてよいと考えられる。今後の筆者らのボタンタケ菌群のセルラーゼ活性のrough screeningや、分類学的形質としてのセルラーゼ活性の定量的な比較研究に際しては、今回用いた2菌株あるいは目的によっては均一な性質の工業製剤などを、比較基準として用いるのが妥当だと考えられる。今回使用した2菌株は、野外から分離培養後すでに5—6年間麦芽寒天培地のみで継代培養を続けてきた菌株であるが、現在でも強い沍紙崩壊力を示している。また、*H. nigricans*においては、古い保存株と新しい保存別株間に有意の活性の差が認められなかった¹⁾。また、*H. peltata*については、昨年度ニューギニアから採集してきた株と比較したところD-240株との間に有意の差が認められなかったことなどからも、この2菌株は、外山¹¹⁾の用いた*Trichoderma koningi*のように、活性が次第に低下するといった傾向はないと思われる。

3. 2の項目での考察によれば、セルラーゼのような酵素の定量的な特性も、原則的には分類学的形質として、特に定性的には同質の酵素(系)をもつと考えられる近縁菌群間の比較の上では有意であると考えられる。しかし、今回の報告からも認められるように、酵素活性は培養条件によって大きく影響され、しかも強く影響する要因の解析はまだ十分ではない。また、種ごとの同種内異株間の活性のばらつきについても、いままでのところ報告が極めて少ない。分類学的形質としての評価は、これらの資料を蓄積した上での研究課題でもある。なお、分類学的形質としての基礎的な考え方については、土居¹²⁾らにおいて考察しておいた。

要 約

*Hypocrea nigricans*と*H. peltata*の各々1菌株を用いて、沔紙崩壊能力の強さを北御門・外山の方法によって測定し、次のような結果をえた。

1. 2菌株共に、麩培養の期間の長さによって活性が変化した。両菌株ともに活性が強い時期は、菌糸が麩培地の表面を十分に被ってから、菌糸や分生胞子の増加がほぼ停止するまでの期間であり、それ以後は活性は低下した。

2. 両菌株共に、麩に外山の処方による塩類を加えて培養することによって沔紙崩壊活性が強化され、かつ活性の消長のパターンも異なり長時間持続した。

3. 培養後の麩麩の処理方法としての風乾・アセトン処理・真空凍結乾燥の3方法間には、沔紙崩壊活性に対する有意の差は認められなかった。また、乾燥麩麩からの粗酵素液の抽出に際しての温度・時間によっていくらか活性に差が生じ、20°—30°Cで約2時間抽出するのが適当であることがわかった。

4. 沔紙崩壊活性の定量的比較を行うためには、基準菌株や均一な酵素製剤を定めて、その活性との相対的な位置関係を比較する範囲内で有意であることがわかった。

5. 上述の方法によって求められるボタンタケ菌群の種間または株間の沔紙崩壊力の定量的差異は、分類学的にも有用な差異として有意であると評価してよい。

本研究に際し、数々の助言を賜った外山信男宮崎大学教授、研究のための便宜をお計らい下さいました小林義雄国立科学博物館植物学研究部部長、ならびに材料を提供して下さいました日清製粉株式会社に深謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 土居則子・倉田宣威：東京家政大学研究紀要，10, 27—36, (1970)
- 2) 外山信男：醸工，31, 315—320, (1963)
- 3) 外山信男：糸状菌セルラーゼの性質とその応用 (大阪大学工学部学位論文), 110頁, タイプ印刷, (1961)
- 4) 小川喜八郎・外山信男：醸工，45, 671—680, (1967)
- 5) 外山信男：醸工，35, 356—362, (1957)
- 6) 外山信男：醸工，36, 375—360, (1458)
- 7) 岩崎康男：繊維素分解酵素 (セルラーゼ) の研究, 59頁, 日本農業研究所, (1968)
- 8) 北御門敬之・外山信男：醸工，40, 85—88 (1962)
- 9) 松葉豊・若松靖弘・岡本昇・小巻利章：醸工，41, 47—51, (1963)
- 10) 島藺平雄：日本食品工業学会講演集, 89—98頁, (1964)
- 11) 外山信男：醸工，36, 348—354, (1958)
- 12) 土居祥兎・土居則子：国立科学博物館研究報告, 14 (2), 273—297, (1971)