高圧剪断破碎機によるパン酵母の破碎特性

Disruption Characteristics of Bakers' Yeast with High-pressure Homogenizer

吉 川 ユ ミ*, ドン ティ アンダオ*, 邢 新 会*, 松 本 幹 治*

Yumi YOSHIKAWA, Anh Dao Thi DONG, Xing XIN-HUI, Kanji MATSUMOTO

Bakers' yeast cell was disrupted with a high-pressure homogenizer (Rannie : MIMI-LAB) without an impact ring to investigate the effect of number of pass time (i. e., disruption time) and applied pressure on the release performances of enzymes (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD) and soluble proteins.

The release of enzymes and proteins was formulated with a disruption rate model by Hetherington et al. The intercellular materials were released from the deformed (i. e., partially disintegrated) cells caused by shear flow through small gap at a pressure lower than 40MPa, and the cells were completely disrupted at a pressure higher than 60MPa. The amount of intercellular materials released into the suspension increased linearly with the number of pass and they were correlated with the particle size of cell debris. Although a linear relationship between the released amount of materials and the particle size was obtained, a lower pressure gave a larger amount of released materials at the same particle size. The amount of released materials was also correlated with electric conductivity of suspension.

Key Words : High-pressure Homogenizer, Disruption, Bakers' Yeast, Superoxide Dismutase

1. 緒 言

菌体内に生産される酵素や生理活性物質などの分離・回収プロセスでは、菌体を破壊してそれらの物質を放出させることは重要な単位操作である。菌体の破壊方法には化学的破壊、物理的破壊、酵素による分解および機械的破壊があるが、機械的破碎法は大量かつ短時間に破壊・放出が可能であることから、プロセススケールの破碎にはビーズミルや高圧剪断破碎法などが用いられている¹⁻³⁾。

高圧剪断破碎は食品、製薬、化学工業において乳化、分散法として広く使用されてきたが、1970年代からは工業的規模の微生物破碎法としても用いられるようになった⁴⁻⁶⁾。その破碎機構についても多く研究されてきており、一般によく使用される装置(Manton-Gaulin 等)では、破碎はホモジナイジングバルブとインパクトリングで起こることが報告されている⁷⁾。ホモジナイジングバルブ部では、粒子ある

いは菌体表面の圧力変動または速度変化により生じる剪断力あるいはキャビテーションによる破壊が起こり、インパクトリング部では衝突による破壊が起こる。しかし、破碎の対象物や菌体の種類によって、これらのいずれの働きが大きく作用するかは異なっている^{1, 7, 8)}。パン酵母の破碎では、インパクトリングへの衝突による破壊は重要なものであり、細胞壁の約50%がこれにより破壊されると報告されている⁹⁾。100MPa程度でインパクトリングへの衝突によって破壊されたパン酵母は、細胞壁は一部が破壊されたり変形したりするのでなく、大きく割れてしまったように見える¹⁰⁾。近年、さらに高圧による菌体の破碎も試みられ、より短時間での細胞内物質の放出が試みられている¹¹⁾。このような高圧破碎では、ほとんどの細胞内小器官が短時間で放出されるが、一部の酵素が失活したり、菌体懸濁液をろ過や遠心分離で固液分離することが困難となるなどの問題がある¹²⁾。

一般に過破碎はインパクトリングで生じるといわれている。本報告では、インパクトリングのない市販の高圧剪断破壊装置を用いて、衝突による破碎が生じにくい条件でパン酵母を破碎したときの、酵素およびタンパク質の放出特性と、破碎過程における破碎物の粒子径変化との関係を調べた。また電気伝導度による、

1998年12月18日受付

* 横浜国立大学工学部物質工学科

(〒240-8501 横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5) TEL 045-339-3980
Department of Material Science and Chemical Engineering,
Faculty of Engineering, Yokohama National University
(79-5 Tokiwadai Hodogaya-ku Yokohama-shi 240-8501)

The yeast suspension is fed axially into the valve seat and when the cells pass through the small gap between valve and valve ball the high pressure is transformed into high velocity. The pressure depends on the width of valve gap that is controlled by a valve.

Fig. 1 Details of homogenizing valve (Ball cell disruption)

放出された酵素量の推定を試みた。なお、本実験で測定した酵素は Cu, Zn-SOD (Cu, Zn-Superoxide dismutase) および Mn-SOD であり、Cu, Zn-SOD はパン酵母の細胞質中に、Mn-SOD はミトコンドリア中に存在している^{13, 14)}。

2. 実験装置および実験方法

2.1 高圧剪断破碎機

高圧剪断破碎機は Rannie 社製 MINI-LAB を用いた。最高破碎圧力は 100MPa、最高流量が 10l/h である。ホモジナイジングバルブは酵母の破碎に有効であると報告された BCD (Ball Cell Disruption) を用いた (Fig. 1)¹⁵⁾。ホモジナイジングバルブ周囲にはインパクトリングはない。

2.2 破 碎

0.05kg の生パン酵母 (*S. Cerevisiae*, オリエンタル酵母^株製) に純水 (逆浸透ろ過水) を加え全量を 1l とした。これをマグネチックスターラー (ADVANTEC MODEL HPS-4) にて 15 分間攪拌し、十分にパン酵母を分散させたものを酵母懸濁液とした。ここで用いたパン酵母は購入後直ちに -20℃ にて冷凍保存したものであり、保存期間は最大 3 カ月とした。

調製された酵母分散液を、ペリスタポンプで MINI-LAB の試料流入口からホモジナイジングバルブ部に送り、20~80MPa の範囲で破碎した。高圧破

碎部は冷却水により十分に冷却した。破碎圧力 80 MPa における 20 回破碎後の破碎酵母懸濁液の最大温度は 43℃ であった。破碎後のパン酵母は、試料流出口から碎氷で冷却されているサンプリングビーカーに送られた。サンプリングビーカー内の破碎酵母懸濁液の全量を流入口に戻して繰り返し破碎することで、破碎回数を増加させた。

採取された破碎酵母懸濁液は直ちに碎水中に保存し、可溶性タンパク質濃度、Cu, Zn-SOD 活性、Mn-SOD 活性および粒子径分布を測定した。さらに電子顕微鏡写真撮影用試料とした。

2.3 タンパク質濃度、Cu, Zn-SOD 活性、Mn-SOD 活性および pH、電気伝導度の測定

破碎酵母懸濁液 1.5ml を遠心分離 (4℃, 6000G, 10 分間)、清澄液を得た。清澄液中の可溶性タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準物質として Bradford らの方法により測定した¹⁶⁾。Cu, Zn-SOD および Mn-SOD の活性はチトクロム法により測定した¹³⁾。清澄液の pH および電気伝導度は、各々ガラス電極および白金電極で測定した。

2.4 粒子径分布の測定

破碎酵母懸濁液を電解液 (0.9% NaCl 水溶液) 中に添加して超音波で 30 秒間分散させ、コールターカウンター (コールター^株製、アパーチャー径 50μm) を用いて、粒子径分布を測定した。

3. 結果と考察

3.1 酵素およびタンパク質の放出特性

Fig. 2 に Cu, Zn-SOD, Mn-SOD およびタンパク質の放出量と破碎圧力および破碎回数の関係を示す。いずれの場合においても、圧力が大きい方が放出速度が速いことがわかる。細胞質中に存在する Cu, Zn-SOD は、タンパク質や Mn-SOD よりも少ない破碎回数で放出平衡に達した。これは ADH (Alcohol dehydrogenase) と同様に、Cu, Zn-SOD は細胞壁の破壊と同時に酵母外に放出されるからである¹⁸⁾。これに対して、ミトコンドリア内に存在する Mn-SOD は、細胞質およびミトコンドリアが破壊された後に放出されるため、Cu, Zn-SOD よりも放出が遅れたと考えられる¹⁷⁾。

タンパク質は 60MPa および 80MPa において $N=10$ までは急激に、その後は緩やかに放出された。Cu, Zn-SOD の放出量は、同一圧力においておよそ 10 回でほぼ一定値に達している。この結果から、10 回までに放出されるタンパク質は、細胞壁の破壊で容易に

Fig. 2 Time courses of released Cu, Zn-SOD, Mn-SOD and Protein

Fig. 3 Relationship between $\log [R_m / (R_m - R)]$ and N

Fig. 4 Relationship between $\log [R_m / (R_m - R)] / N$ and P

放出される細胞質や液胞などの破壊されやすい細胞小器官中のタンパク質が主なものであり、その後の緩やかな放出量の増加は、 $N=10$ 程度では未破壊であった細胞内外の小器官が徐々に破壊されたことによると考えられる。

3. 2 放出速度の圧力依存性

高压破碎法によるパン酵母の破碎とそのタンパク質の放出は、Hetherington らによってモデル化され、次式で示されている¹⁸⁾。

$$\log [R_m / (R_m - R)] = KNP^\alpha \quad (1)$$

ここで、 R_m はタンパク質あるいは酵素の最大放出量、 R はある破碎回数におけるタンパク質あるいは酵素の放出量、 N は破碎回数、 P は破碎圧力、 K は速度定数である。 α は指数であり、菌体の種類や培養条件によって異なる¹⁹⁾。破碎圧力のタンパク質、酵素の放出への影響は α で表され、両対数において $\log [R_m / (R_m - R)] / N$ を P に対してプロットしたときの勾配から得る。Fig. 3 に一例として Mn-SOD の放出にお

ける $\log [R_m / (R_m - R)]$ と N の関係を示す。これらの直線から得られた $\log [R_m / (R_m - R)] / N$ を P に対してプロットし、Fig. 4 を得た。タンパク質および Cu, Zn-SOD の放出も同様にプロットした。ここで Cu, Zn-SOD とタンパク質の最大放出量は、Fig. 2 から破碎圧力 80MPa, $N=20$ における値を用いた。また Mn-SOD の最大放出量は $N=20$ と $N=25$ における値がほぼ同じであったので、 $N=20$ の値を用いた。なお放出特性は N の大きなところでは必ずしも Eq. (1) に従わないので、主に $N < 16$ におけるデータを用いて Fig. 4 の結果を求めた。

いずれの場合においても P と KP^α の関係はほぼ直線となり、それぞれの直線の勾配は、 $\alpha_{\text{protein}} = 1.4$, $\alpha_{\text{Cu, Zn-SOD}} = 1.0$, $\alpha_{\text{Mn-SOD}} = 1.3$ となった。

Hetherington らが用いたインパクトリングを配したナイフエッジ型バルブにおける破碎では、 $\alpha = 2.9$ であった¹⁸⁾。インパクトリングへの衝突による細胞の破壊は、剪断力による破壊と比較し、バルブギャップにおける酵母懸濁液の流速、すなわち圧力による影響

Fig. 5 Cumulative particle size distribution of disrupted cells

が大きい。本実験で用いた高圧剪断破砕機にはインパクトリングは配しておらず、衝突による破砕よりも主に剪断力による破砕が生じるため、本装置の α は2.9よりも小さかったと考えられる。

3.3 破砕酵母の粒子径分布変化と形状観察

60MPa以下の圧力における破砕酵母の粒子径分布を、各破砕回数(N)ごとに測定した結果をFig. 5に示す。なお80MPaにおいては、剪断以外の破砕が一部で生じる可能性があるため、ここでは比較しなかった。20MPaの破砕圧力では20回の破砕にも関わらず粒子径の分布の変化は小さかったが、40、60MPaでは破砕回数の増大に伴い細粒子径側へのシフト幅も大きくなった。そこで破砕回数と25%、50%粒子径の関係をFig. 6に示す。50%粒子径は全ての圧力において、破砕初期は急激に、その後は穏やかにほぼ直線的に減少した。工業的規模の分離・精製においては細胞破砕物の除去は重要な工程であり、破砕物の粒径分布はその工程に大きな影響を及ぼす。高圧剪断破

Fig. 6 Relationship between N and D_{25} or D_{50}

砕法と共に細胞破砕法として工業的に広く用いられているビーズミルの場合と、ここで得られた結果は著しく異なる²⁰⁾。ガラスビーズによる磨砕の場合には、20MPaおよび40MPaの場合、60MPaの場合と比較して50%粒子径の低下は小さかったことから、細胞の破砕部分は一部分であり、その部分から細胞内物質の放出が少しずつ起こっている、あるいは細胞の変形が起こった程度であることが予想された。一方、60MPaにおいては、特に25%粒子径の減少が大きなことから20MPa、40MPaの場合よりも細胞がより激しく破壊されている、あるいは破砕物の微細化が起こっているものと推定される。そこで、細胞が実際にどのように破壊されているかを調べるために、破砕過程の細胞破砕物の状態を電子顕微鏡で観察した。各圧力における破壊細胞の電顕写真をFig. 7に示す。20MPaでは、 $N=5$ までの破砕では、破砕回数の増大に伴いパン酵母が徐々に押し潰される様子が見られた(Fig. 7 (b))。このとき細胞内容物と判断できるようなものはほとんど観察されなかった。 $N=10$ ではパン酵母の形状の変化は大きくなり、細胞内容物の漏出がみられたが細胞壁は残っており、大きな亀裂は観察されなかった(Fig. 7 (c))。 $N=20$ では細胞の変形はかなり生じているが、細胞内物質の放出はあまり観察されなかった(Fig. 7 (d))。これらの形状と粒子径分布の変化から、20MPaにおいては、ミトコンドリアなどの細胞内小器官および細胞質などは急激に放出されることはなく、ホモジナイジングバルブを通過する度に押し潰され徐々に放出されると考えられる。

40MPaでの破砕過程におけるパン酵母の形状変化

a) Whole cells

d) $P=20\text{MPa}$, $N=20$

b) $P=20\text{MPa}$, $N=5$

e) $P=40\text{MPa}$, $N=5$

c) $P=20\text{MPa}$, $N=10$

f) $P=60\text{MPa}$, $N=5$

Fig. 7 SEM photographs of disrupted cells

および内容物の漏出は、20MPaの場合と類似していたが、より少ない破碎回数で細胞の変形が進行することが観察された (Fig. 7 (e))。

60MPaでは、破碎されたパン酵母の形状は20MPa, 40MPaの場合とは異なり、破碎初期から裂かれたような形が観察された (Fig. 7 (f))。これらの形状と粒子径分布の変化から、60MPaにおける破碎は、破碎回数が少なくても「押し潰し」ではなく、より強力な剪断破壊による細胞内物質の放出が起こっていると考えられる。80MPaにおいても60MPaと同様な結果が得られている。以上の結果から、細胞質内

物質は低圧力では細胞の一部損傷に伴う押し潰しにより徐々に放出されるが、高圧力下では剪断破壊による細胞の引き裂きにより放出されることが確認できた。

3. 4 細胞内物質の放出特性と粒子径の関係

破碎の進行に伴う50%粒子径の変化とタンパク質、Cu, Zn-SODおよびMn-SODの放出量との関係をFig. 8に示す。すべての細胞内物質の放出量は50%粒子径の減少に伴って同様の傾向で増加した。Cu, Zn-SODはわずかな粒子径変化で放出が始まり放出速度が速かった。タンパク質およびMn-SODはCu, Zn-SODと異なり、粒子径が一定値以下にならない

Fig. 8 Relationship between D_{50} of cell debris and activities of released SOD or concentration of released protein

と放出されず、Cu, Zn-SOD に比較して放出速度も遅かった。

また Fig. 9 は、タンパク質の放出率 ($r_p = R_{\text{protein}} / R_{\text{mprotein}}$) に対する Cu, Zn-SOD の放出率 ($r_{\text{Cu, Zn-SOD}} = R_{\text{Cu, Zn-SOD}} / R_{\text{mCu, Zn-SOD}}$)、および Mn-SOD の放出率 ($r_{\text{Mn-SOD}} = R_{\text{Mn-SOD}} / R_{\text{mMn-SOD}}$) の関係を示したものであるが、Mn-SOD の放出特性はタンパク質の放出特性とほぼ同じであることがわかる。このような Cu, Zn-SOD と Mn-SOD の放出特性の相違は、両者の酵素の存在場所の違いに起因する。すなわち、Cu, Zn-SOD は、ADH と同様に細胞膜近傍などの細胞質内に存在するため、細胞の部分的な破壊でも液中に溶出し、放出速度も大きい。一方、Mn-SOD は、細胞内小器官のミトコンドリア内にあり、Mn-SOD が放出されるためにはまずミトコンドリアが細胞から放出され、放出されたミトコンドリアが更に破壊されなければならない。またタンパク質においても、多くのタンパク質は細胞内小器官の構成成分となっているが、細胞から放出された高分子量のタンパク質が測定可能な中分子量以下の可溶性タンパク質になるのに機械的作用を受ける必要があるために、Mn-SOD と同様に放出速度が遅くなっていると考えられる。

次に Fig. 8 における放出量に及ぼす圧力の影響であるが、いずれの細胞内物質においても、同一放出量に

Fig. 9 Relationship of relative release rates of intercellular material

おける粒子径は、わずかであるが低圧の方が大きくなっている。 D_{25} 粒子径で比較すると、この差はより顕著になる。このような差が生じるのは3.3節で述べた圧力による破壊作用の差によるものと考えられる。しかしながら、低圧の場合には、最大放出量に達するのに要する破碎回数は高圧力に比較して大きくなるため、短時間で放出処理をしなければならない場合には高圧力が適する。

一般にパン酵母をはじめとする菌体からタンパク質や酵素を分離・精製するプロセスにおいては、過破碎はエネルギーを無駄にするだけでなく、ダウンストリームでの固液分離を困難にし、精製コストを大きくする。高圧剪断破碎法により、目的とする物質によっては、低圧で破碎回数を適当に選択することで過破碎を伴わずに抽出できる可能性があることが示された。また、低圧による破碎では、破碎部位の発熱も小さいため、熱に弱い酵素等の放出には適する。

3.5 細胞内物質の放出特性と電気伝導度の関係

粒子径と細胞内物質の放出量にある程度相関関係が見られたが、前報と同様に pH および電気伝導度の測定による放出量の予測を試みた²⁰⁾。遊星ミルおよびビーズミルでは、電気伝導度と破碎により放出された核酸量に相関関係があることが確認されている^{19, 20)}。高圧剪断により破碎されたパン酵母破碎懸濁液の清澄液においても、破碎の進行に伴う pH と電気伝導度の変化が観察された。pH の変化はわずかであったが、電気伝導度の変化は著しかった。結果を Fig. 10 に示す。Fig. 10 は $r_p (= R_{\text{protein}} / R_{\text{mprotein}})$ に対し $E (= (\lambda - \lambda_0) / (\lambda_{\infty} - \lambda_0))$ をプロットしたものである。ここで λ_0 , λ_{∞} はそれぞれ破碎回数0回および60MPaにおける20回破碎の λ 値である。この図より r_p と E

Fig. 10 Relationship between relative release rate of protein and relative electric conductivity of suspension

の関係は良好な相関があり、かつ操作圧力により二つのパターンに分かれることがわかる。すなわち、同一 r_p における E の値は、高圧力の方が低圧力と比較して大きくなっている。これは Fig. 7 に見られるような、40MPa 程度の低圧力による「押し潰し」よりも、60MPa に見られるような高圧力による「剪断破壊」の方が細胞内に含まれていた遊離アミノ酸、核酸、無機イオンなどの電解質成分がより多く放出されたためである。また Fig. 9 (a) から r_p と $r_{Cu, Zn-SOD}$ また r_{Mn-SOD} の相関関係があるため、40MPa 以下および 60MPa から 80MPa の範囲においては、 E の測定によりこれらの物質の放出率の予測が可能であることがわかった。しかしながら、これ以外の範囲、特に 40MPa から 60MPa の範囲においては、二つの異なる

r_p と E の関係の境界域があることが予想され、これらの関係の詳細な調査なしでは、 E による放出率の予測が過大あるいは過小値となる可能性がある。

4. 結 言

インパクトリングのない高圧剪断破碎装置によるパン酵母の破碎における細胞内物質（タンパク質、Cu, Zn-SOD および Mn-SOD）の放出特性を検討し、以下の結果を得た。

- (1) タンパク質、Cu, Zn-SOD および Mn-SOD の放出速度は、Eq. (1) の Hetherington らのモデルに一致した。しかしながら、 α の値はインパクトリングがある場合に比較して小さかった。
- (2) 40MPa までの破碎圧力では、破碎初期にはパン酵母の細胞壁に著しい損傷は見られず、細胞が押し潰されて変形していた。細胞内物質は破碎を繰り返すことにより徐々に押し出されていると考えられる。60MPa 以上では細胞は引き裂かれ、細胞内物質は破碎初期から放出された。
- (3) 細胞内物質の放出量と破碎物の粒子径には相関関係があり、粒子径は放出量の増加に連れてほぼ直線的に小さくなった。また、同一放出量において、低破碎圧力の方が高圧力に比較して 50 % あるいは 25 % 粒子径が大きかった。
- (4) パン酵母破碎物懸濁液の電気伝導度は細胞内物質の放出量と相関関係があり、これらの関係が明らかな範囲では、電気伝導度を測定することによりこれらの物質の放出量を推定することができる。

Nomenclature

D_{25} : 25 % particle size of disrupted yeast cells (μm)	N : number of disruption time (—)
D_{50} : 50 % particle size of disrupted yeast cells (μm)	P : disruption pressure (MPa)
E : reduced electric conductivity of yeast suspension (—)	R : enzyme activity or weight of protein per unit volume (U/m^3) or (kg/m^3)
K : release rate constant of enzyme or protein (1/min)	R_m : final value of R (U/m^3) or (kg/m^3)
	λ : electric conductivity of yeast suspension (S)

References

- 1) Middelberg, P. J. A.: "Process-scale Disruption of Microorganisms", *Biotechnology Advances*, **13**, (3), 491-551 (1995)
- 2) Engler, R. C.: "Cell Disruption", In Separation Processes in Biotechnology, (Juan A Asenjo editor), Marcel Dekker, Inc. (New York and Barsel), pp. 95-105 (1990)
- 3) Schutte, H. and M. R. Kula: "Bead Mill Disruption", In Separation Processes in Biotechnology, (Juan A Asenjo editor), Marcel Dekker, Inc. (New York and Barsel), pp. 107-141 (1990)
- 4) Follows, M., P. J. Hetherington, P. Dnnill and M. D. Lilly: "Release of Enzyme from Bakers' Yeast by Disruption in an Industrial Homogenizer", *Biotech. and Bioeng.*, **13**, 549-560 (1971)
- 5) Hetherington, P. J., M. Follows and P. Dnnill:

- "Release of Protein from Bakers' Yeast by Disruption in an Industrial Homogenizer", *Inst. of Frans. Instn. Chem. Engrs.*, **49**, 142-148 (1971)
- 6) Brookman, J. S. G. : "Mechanism of Cell Disruption in a High-pressure Homogenizer", *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 371-383 (1974)
 - 7) Shamlou, P. A., S. F. Siddiqi and N. J. Titchener-Hooker : "A Physical Model of High-pressure Disruption of Bakers' Yeast Cells.", *Chem. Eng. Sci.*, **50**, (9), 1383-1391 (1995)
 - 8) Save, S. S., A. B. Pandit and J. B. Joshi : "Microbial Cell Disruption : Role of Combination", *Chem. Eng. J.*, **55**, 1364-1372 (1994)
 - 9) Moore, K., M. E. Hoare and P. Dunnill : "Disruption of Bakers' Yeast in High-pressure Homogenizer", New Evidence on Mechanism, *Enzyme. Microb. Technol.*, **12**, 764-770 (1990)
 - 10) Lang, P. : "Cell Disruption by means of Hyper Homogenizer", Lannie A/S Denmark (1987)
 - 11) Sarah, C. A., Chrintine, Y. Chiwan, J. Meirin and L. Robert : "An Investigation of the Disruption of Microorganisms using a new Type of Cell Homogenizer", *Ichem E Res. Event, Eur. Conf. Young Res. Chem. Eng.*, **1**, 25-54 (1996)
 - 12) Siddiqi, S. F. , N. J. Titchener-Hooker and P. A. Shamlou : "Simulation of Particle Size Disruption Changes Occurring during High-pressure Disruption of Bakers' Yeast", *Biotechnology and Bioengineering*, **50**, 145-150 (1996)
 - 13) Mc. Cord, J. M. and I. Fridovich : "Superoxide Dismutase". *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969)
 - 14) Weisiger, R. A. and I. Fridovich : "Superoxide Dismutase", *J. Biol. Chem.*, **248**, 3582-3592 (1973)
 - 15) Madson, F. S. and C. I. Ibsen : "Cell Disruption by means of High Presure",. Dept. of Biotechnology, Engineering Academy of Denmark, Copenhagen, January (1987)
 - 16) Bradford M. M. : "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254 (1973)
 - 17) Melendres, A. V., H. Honda, N. Shiragami and H. Unno : "Enzyme Release Kinetics in Cell Disruption Chamber of a Beads Mill", *J. Chem. Eng. of Japan*, **26**, (2), 148-152 (1993)
 - 18) Hetherington, P. J., M. Follows and P. Dunnill : "Release of Protein from Bakers' Yeast by Disruption in an Industrial Homogenizer", *Inst. of Frans. Instn. Chem. Engrs.*, **49**, 142-148 (1971)
 - 19) Gray, P. P., P. Dunnill and M. D. Lilly : "The Continuous-flow Isolation of Enzyme", In Proc. IV IFS : *Ferment. Thechnol. Today*, (Terui, G., Editor) 347-351 (1972)
 - 20) Matsumoto, K., S. Ito, H. Ohya and M. Naito : "The Release of Enzymes and Protein from Bakers' Yeast Disrupted by an Agitator Bead Mill", *J. Soc. Powder Technol., Japan*, **26**, 424-429 (1989)