

好熱性細菌の分離同定とその熱耐性度

吉田直人*・金澤優子*・小川喜八郎*

Isolation and Identification of Thermophilic Bacterium and it's Resistant Levels to Heat

Naoto YOSHIDA*, Yuko KANAZAWA* and Kihachiro OGAWA*

(平成11年5月11日 受理)

Summary

The isolated bacterium was identified as *Alcaligenes* sp. by the various physiological tests. The optimal growth temperature and pH of isolated bacterium was 50 °C, and pH 6-7, respectively. It was 1/100,000 of the orders when the rate of viable cell was found after this isolated bacterium was cultivated in the LB liquid medium and heat treatment at 100 °C for 30 min was done. Existence cells were cultivated again after the heat treatment, and viability of treated cells was calculated. Though this treatment was repeated three times, there was no change comparatively of the viable cell number. Therefore, it is unlikely that isolated bacterium is adapted to heat. When cell density was changed and the heat treatment was done, there were no relations in the cell concentration, suggesting that the rate of viable cell number was fixed by 1/100,000 of orders. This isolated bacterium remained viable up to 100 °C, the heat treatment for 60 min, and was shown to have high degree of heat tolerance.

Key words: Thermophilic bacteria, *Alcaligenes*, Heat treatment, Heat resistance

緒言

好熱性菌とは高温で生育できる微生物の総称である。最初の好熱性細菌の単離についての報告はフランスの Miquelによるもので、1879年のことである。単離された菌は今日、*Bacillus stearotherophilus*として記載される菌か、その近縁種と思われる。以来、好熱菌の研究が始まるが、初めのうちは、*Bacillus*属の好熱性細菌が対象であり、これらは長い間、科学者の興味をそそっていた。1970年代から75 °C以上でも生育できる好熱性菌が人工的熱水環境、火山地帯、温泉などから発見され、その分布が調べられている。さらに最近に

なって、100 °Cまたはそれ以上の温度で生育可能な細菌が見つかり¹⁾、急速に研究者の層が広がりはじめた。

好熱性細菌は学問的にも、応用上もたいへん興味深い研究材料である。学問的な面からいうと、分子生物学、遺伝学、生化学、進化、分類、生態学、そのいずれをとっても従来見られなかった特徴を有している²⁾。またバイオテクノロジーといった応用面からみると、高温で用いられるバイオリクターの酵素の供給源としてたいへん有望である。本研究では市販粉末酵母エキス中より新規好熱性細菌を分離することに成功し、様々な生理学的試験を行ない、分離菌の同定を行なった。さらに分離菌の熱耐性度を調べた。

*宮崎大学農学部生物機能工学講座

材料および方法

1. 菌株の分離

140℃, 3時間乾熱滅菌した500 ml容ガラス製三角フラスコに滅菌蒸留水を100 ml入れ, そこに粉末酵母エキスS (日本製薬製) を0.5 g入れて溶解させ, 無菌的にシリコン栓で口を塞いだ. フラスコは直火で吹きこぼれぬよう30分間煮沸した後, 30℃, 150 rpmで24時間培養した. その培養液をLuria-Bertani (LB) 平板培地³⁾に塗布し, シングルコロニーを取得した. シングルコロニーはLB液体培地にて30℃, 150 rpmで24時間培養し, 再び30分間煮沸し, その煮沸菌を新たなLB液体培地に植え, その生育によって熱耐性を示す株であることを確認した.

2. 最適生育温度

分離菌は一白金耳, 5 mlのLB液体培地に植え, 30℃, 150 rpmで24時間前培養した. 前培養菌体は5 mlのLB液体培地に1/100量 (50 μ l) になるように加え, 20, 30, 40, 50, 60, 70℃にて46時間静置培養を行なった. 各温度での生育度は分光光度計UV-1600 (島津製作所製) を用い, OD₅₅₀ の値を測定することにより, 培地濁度として表し, 30℃での培地濁度を100として相対生育度を求めた.

3. 最適生育pH

分離菌は一白金耳, 5 mlのLB液体培地に植え, 30℃, 150 rpmで24時間前培養した. 前培養菌体は初発pHを3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10に調整したLB液体培地 5 mlにそれぞれ1/100量 (50 μ l) になるように加え, 30℃, 150rpmで24時間培養した. 各pHでの生育度は分光光度計を用い, OD₅₅₀ の値を測定することにより, 培地濁度として表し, pH 6での培地濁度を100として相対生育度を求めた.

4. 生理学的諸性質

分離菌の運動性の有無, 孢子形成の有無, 細胞の形態, 嫌気状態での生育の有無を調べ, さらにカタラーゼ試験, オキシダーゼ試験, 糖発酵性試験 (O-Fテスト) を定法に従って行った⁵⁾. グラム染色はHuckerの変法⁴⁾に従った.

5. 耐熱性試験-1

LB平板培地に生育させた分離菌を5 mlのLB液体培

地に一白金耳植え, 30℃, 150 rpmで24時間前培養した. さらに前培養菌体をLB液体培地 5 mlに1/100量 (50 μ l) になるように加え, 30℃, 150 rpmで24時間培養した.

- a. 培養液を沸騰水中に30分間完全に浸して熱処理とした. その後, 熱処理培養液をLB平板培地に50 μ l塗布した. 熱処理をしないものも同時にLB平板培地に塗布し, 対照とした. 平板培地は30℃で24時間置いた後, コロニー数を数えた.
- b. 熱処理した菌体は再びLB液体培地 5 mlに1/100量 (50 μ l) になるように加え, 30℃, 150 rpmで24時間培養した.

a, bの操作を3回繰り返し, 3回の熱処理毎, 生菌数の割合を求めた. 生菌数の割合は生細胞数/全細胞数で表したcolony forming unitである.

6. 耐熱性試験-2

菌の密度を変えて30分間の熱処理をし, 生菌数の割合に変化があるか調べた. すなわち分離菌をLB液体培地にて培養し, 菌の密度を 4×10^8 , 8×10^8 , 12×10^8 , 16×10^8 , 20×10^8 cells/mlに調製し, 熱処理を行なった. その後それぞれの熱処理培養液をLB平板培地に50 μ l塗布した. 熱処理をしないものも同時にLB平板培地に塗布し対照とした. 平板培地は30℃で24時間置き, コロニー数より生菌数の割合を求めた.

7. 耐熱性試験-3

熱処理時間を変えて生菌数の割合に変化があるか調べた. すなわち分離菌を5 mlのLB液体培地にて30℃, 150 rpmで24時間培養し, 30, 40, 50, 60分の熱処理を行なった後, それぞれの熱処理培養液をLB平板培地に50 μ l塗布した. 熱処理をしないものも同時にLB平板培地に塗布し対照とした. 平板培地は30℃で24時間置き, コロニー数より生菌数の割合を求めた.

結果

1. 菌株の分離

粉末酵母エキスSを溶解させ, 30分間煮沸の後, 30℃, 150 rpmで24時間培養するとなんらかの菌が生育してきたことが認められた. その後生育してきた菌の培養懸濁液をLB平板培地に塗布し, シングルコロニー

を5株取得した。それぞれのシングルコロニーはLB液体培地にて30℃、150 rpmで24時間培養し、再び30分間煮沸し、その煮沸菌を新たなLB液体培地に植え、生育の有無を見たところ、いずれの分離菌も生育が認められた。コロニーの形状がすべて一致していることより分離菌5株はすべて同じ種と考えられる。したがって、そのうちの1株を供試菌として今後の実験に用いた。

2. 最適生育温度及びpH

Fig. 1Aに示すように本分離菌の生育温度範囲は20-60℃であり、最適生育温度は50℃であった。またFig. 1Bに示すように本分離菌の最適生育pHは6-7の中性から弱酸性であった。

3. 生理的諸性質

LB液体培地 5 mlにて、30℃、150 rpmで24時間培養したものは動きが認められたが、10%塩化第二水銀を培地に少量加えて死滅させたものは動きがなくなった。

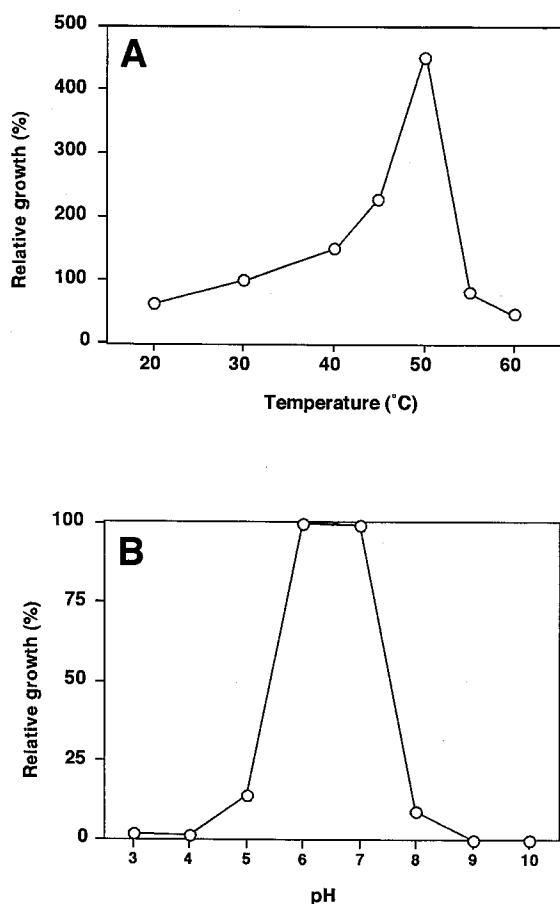


Fig. 1. Optimum temperature (A) and pH (B) of isolated thermophilic bacteria for growth.

たので、本分離菌の運動性が確認された。

生細胞はメチレンブルーで青く染まるが、胞子はメチレンブルーで染まらない。本分離菌は細胞全体が青く染まり、染まらない部分がなかったため、胞子形成はないといえる。

本分離菌の細胞の形態は長桿状であった (Fig. 2)。

Huckerの変法⁴⁾にしたがって判別したところ、本分離菌はグラム陰性であった。

好気性細菌は高層培地の表面とそれに近い部分にのみ生育する。通性嫌気性細菌は全般に生育が見られる。嫌気性細菌は試験管の下部に生育する。本分離菌の場合は表面とそれに近い部分にのみ生育が認められたため、好気性細菌であるといえる。

カタラーゼを有する細菌は、過酸化水素を分解して酸素ガスの気泡を発生するので、カタラーゼを有しない細菌と容易に区別することができる。本分離菌の場合、気泡の発生が認められたので、カタラーゼ陽性であるといえる。

本分離菌はオキシダーゼ陽性であった。

パラフィンでシールしない試験管が黄色、シールした試験管が緑になれば好氣的に糖を分解して酸を生成することを示し、前者及び後者とも黄色になれば発酵により嫌氣的に糖を分解して酸を生成することを示す。また両者とも色の変化がなければ糖を分解して酸を生成しないことを示す。本分離菌の場合、パラフィンでシールした試験管は緑色であり、シールしない試験管も同様に緑色であったので、本分離菌は糖を分解して酸を生成しないことを示した。ガスの発生もまったく認められなかった。

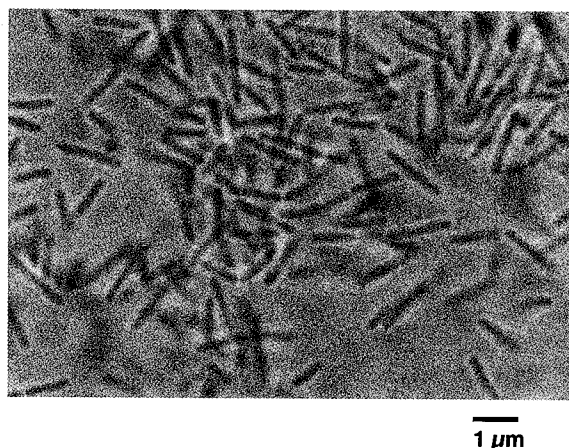


Fig. 2. Microphotographs of isolated bacteria from Yeast Extract-S ($\times 1,000$).

以上の生理学的性質 (Table 1) と Cowan と Steel⁵⁾ の分類表より本分離菌株は *Alcaligenes* 属細菌であると考えられ, *Alcaligenes* sp. NY98 と命名した。

本分離菌を 5 ml の LB 液体培地に植え 30°C, 150 rpm で 24 時間前培養後, 30 分間熱処理を行なったものと, 対照として熱処理を行なわなかったものをそれぞれ 50 ml の LB 液体培地に菌数を揃えて 500 μ l 植え, 30°C, 150 rpm で培養し, それらの生育を濁度 (OD₅₅₀) によって比較したところ, Fig. 3 のようになり, 熱処理をしたものは増殖までにラグタイムがあるが, 約 10 時間を経た後, 明らかに増殖が認められた。このことは本分離菌は 100°C 中で 30 分間処理しても死滅せず, 熱耐性を有することを示している。次にどの程度の熱耐性があるか耐熱性試験-1, 2, 3 により詳しく調べた。

4. 耐熱性試験-1

Fig. 4A に示すように, 1 回目の熱処理での生菌数の割合は $(2.1-2.7) \times 10^{-5}$, 2 回目は $(0.19-1.44) \times 10^{-5}$, 3 回目は $(2.2-4.0) \times 10^{-5}$ と変動はあるも

Table 1. Morphological and physiological characteristics of isolated thermophilic bacterium.

Mobility	+
Spore formation	-
Cell shape	Rod
Size width (μ m)	0.2-0.5
length (μ m)	1.5-2.0
Gram-stain	-
Oxygen relation	Aerobe
Catalase	+
Oxydase	+
Fermentation	No action on carbohydrate

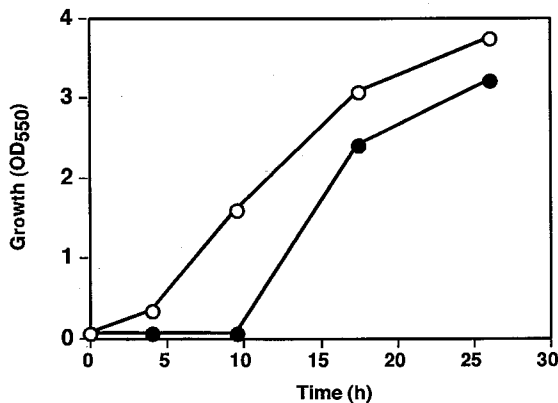


Fig. 3. Growth curve of isolated thermophilic bacteria with (●) or without (○) heat treatment for 30 min at 100°C.

の生菌数の割合は約 10 万分の 1 のオーダーで一定しており, 100°C の環境に対して耐性を持つことが示された。しかしながら本菌株は熱に順応して生菌数の割合が増すということはないようである。

5. 耐熱性試験-2

Fig. 4B に示すように, 菌の濃度を変えて熱処理を行ない, 生菌数を調べたところ, 若干の変動はあるものの生菌数の割合は耐熱性試験-1 の結果と同様に 10 万分の 1 のオーダーで一定していた。このことは菌の

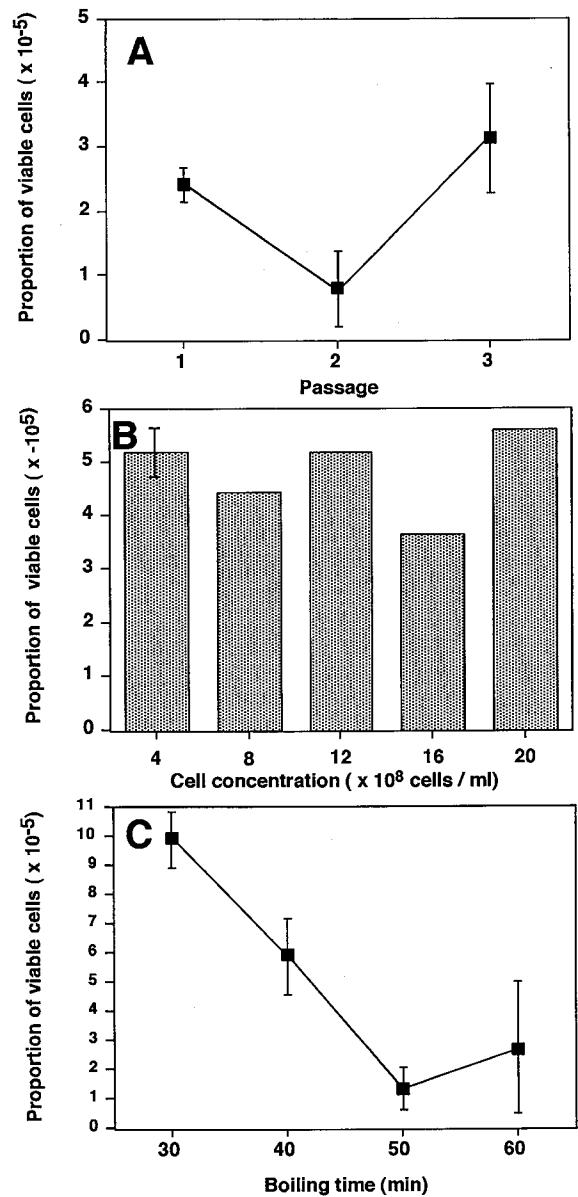


Fig. 4. The rate of viable cells of isolated thermophilic bacteria depend on passage (A), cell concentration (B), and boiling time (C) after heat treatment. Error bars represent the standard errors of three independent experiments.

密度が高くなればなるほど生菌数の絶対数は多くなり、熱というストレスが加わった場合、多くの細胞を生き延びさせることを示している。

6. 耐熱性試験—3

Fig. 4Cに示すように熱処理を30–60分行ない、生菌数の割合を調べたところ、熱処理時間が長くなるほど生菌数の割合は減少するが、60分の熱処理においてもなお10万分の1のオーダーで生細胞が確認され、60分の煮沸においても死滅せず、強い熱耐性があることがわかった。

考 察

粉末酵母エキス製造には、熱水抽出、スプレードライヤーなど熱が加わる工程があり、この工程ではほとんどの細菌は死滅してしまうと考えられるが、本分離菌の様に、60分間の煮沸によっても死滅しない細菌が生き残り、混在していたと考えられる。しかも乾燥粉末であるので水分活性は低く、おそらく本分離菌は乾燥状態においても耐性があると考えられる。保存食品中をはじめこのような乾燥及び高熱環境に耐えうる細菌には孢子を形成して生き延びる、*Bacillus*属細菌や*Clostridium*属細菌が挙げられるが、本分離菌はグラム陰性であり、孢子形成は認められなかった。材料および方法1に記載した要領で、トリプトン (Difco社製)、ポリペプトン (日本製薬製)、及び宮崎県内20地点の土壌から同様の方法で菌の分離を試みたが、まったく分離することはできなかった。

好熱性菌の定義は研究者によっていろいろ異なっているが、Brock⁹⁾によると、一般的に見て、そのグループが生育できる最高またはそれに近い温度で生きるものを好熱性菌と定義している。細菌の場合はTable 2に示したように、高度好熱性細菌と中度好熱性細菌の2つのグループに分けられる。前者には *Thermus*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Methanobacterium*, *Sulfolobus*, *Calderia* 属細菌が挙げられ、最適生育温度が65–80℃である。後者には *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Thermoactinomyces*, *Pseudonocardia*, *Micropolyspora*, *Thermoplasma* 属細菌が挙げられ、最適生育温度は50–65℃である。これらの好熱性細菌は *Sulfolobus*, *Calderia* 属細菌に代表されるように好酸性細菌、*Bacillus*, *Clostridium* 属細菌といったグラム陽性孢子形成細菌、*Thiobacillus*, *Desulfotomaculum* 属細菌と

いった独立栄養細菌、*Thermoactinomyces*, *Pseudonocardia*, *Micropolyspora* といった放線菌、*Sulfolobus*, *Thermoplasma* 属細菌といった古細菌のグループに分けられる。

本分離菌 *Alcaligenes* sp. NY98は最適生育温度が50℃であるので、中度好熱性細菌ということになる。中度好熱性細菌には *Bacillus* や *Clostridium* 属細菌といった孢子形成能のあるグラム陽性細菌と放線菌および若干の独立栄養細菌と古細菌しかない。*Alcaligenes* 属細菌は孢子形成能がなくグラム陰性であるので、これまでに報告された中度好熱性細菌のどのグループにも属さず、非常に新規性があるといえる。

本分離菌の場合は独立栄養細菌のように煩雑な培地を作る必要もなく、嫌気状態を作る必要もない。また好熱性細菌は一般的には低温に保存すると死滅してしまうので、その保存が難しいが、本分離菌の場合は–70℃の低温層で凍結保存が可能である。このように取り扱いが他の好熱性細菌と比べて簡便であるので、耐熱性酵素等有用物質が見つければ、低コストの生産や応用が期待できる。

本分離菌の熱耐性度は、Fig. 4Cに示すように100℃、60分間の処理においても死滅しないのであるが、処理したすべての細胞が生き残るのではなくて、必ず決まって一つの細胞集団において耐性を持つのはその10万分の1である。細胞同士が高密度に寄り集まりお互いを保護し合うという細胞の相互作用があるのではないかと考え、Fig. 4Bに示すように細胞濃度を変えて熱処理をしてみた。もしも細胞同士のなんらかの相互作用があるとしたら、細胞濃度が高くなれば熱処理による生菌数の割合は増すはずであるが、Fig. 4Bに示すように細胞濃度に関係なく、生き残るのは処理した細胞の10万分の1のオーダーである。またFig. 4Aに示すように熱処理で生き残ったものを培養し、再び熱処理をする。この操作を繰り返すことにより熱耐性度が増し、生菌数の割合が増えるのではないかと考えたが、3回の熱処理において熱への馴養はみられなかった。以上の結果はあたかも多数の細胞が限られた細胞を守るため、犠牲になっているかのように見える。あるストレスが加わった場合、集団中の細胞から決まった数を守るようななんらかの細胞間システムが存在するのではないかと考えている。今後熱耐性に関する遺伝子の解析など分子生物学的立場から本分離菌の耐熱性機構をより詳しく解明していく予定である。

Table 2. Optimun growth temperature and pH for thermophilic bacteria.

Microbe	Origin	Growth temperature (°C)		pH		
		Optimun	Growth range	Optimun	Growth range	
(Extreme thermophilic bacteria)						
<i>Thermun thermophilus</i> ⁷⁾	Hot spring	65-75	48-85		6.5-9	
<i>T. aquaticus</i> ⁸⁾	Hot spring	70	40-80		7.5-9	
<i>T. flavus</i> ⁹⁾	Hot spring		40-81		6-9	
<i>Bacillus caldotenax</i> ^{10,11)}	Hot spring	80	-85	7.5-8.5		
<i>B. caldolyticus</i>	Hot spring	72	-82	6-8		
<i>Thiobacillus thermophilica</i>	Hot spring	55-65	40-80			Autotrophs
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ¹²⁾	Drainage mud	65-70	40-80	7.2-7.6	6-8.5	Anearobes, Autotrophs
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ¹³⁾	Acidic hot spring	70-75	55-85	2-3	1.0-5.9	Acidophiles, Autotrophic archae
<i>Calderia acidophila</i>	Acidic hot spring		50-80		1.5-5	Acidophiles, Aurotrophs
(Themophilic bacteria)						
<i>Bacillus acidocaldarius</i> ¹⁴⁾	Soil, Hot spring	65	42-70	2-3	2-6	Acidophiles
<i>B. stearothermophilus</i> ¹⁵⁾	Compost Canned food	50-65	30-75	7	5-	
<i>B. coagulans</i> ¹⁶⁾	Acidic foods		15-60	6	4-	
<i>Clostridium thermoaceticum</i> ¹⁷⁾			45-65			Anearobes
<i>C. thermosaccharolyticum</i> ¹⁸⁾	Soil	55	45-65			Anearobes
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> ¹⁹⁾	Subterranean heat soil	55	45-70			Autotrophs, Anearobes
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> ²⁰⁾	Soil, compost	60				Actinomycetes
<i>T. sacchari</i> ²¹⁾	Soil	55-60	35-65			Actinomycetes
<i>Pseudonocardia thermophila</i> ²²⁾	Manure	40-50	28-60			Actinomycetes
<i>Micropolyspora faeni</i> ²³⁾	Compost	50	32-60			Actinomycetes
<i>Thermoplasma acidophilum</i> ²⁴⁾	Hot spring	59	37-65	1-2	0.5-3	Acidophiles, archae
<i>Alcaligenes</i> sp. NY 98	Yeast extract	50	20-60	6-7	5-8	This experiment

要 約

粉末酵母エキス中より好熱性細菌を分離した。種々の生理学的試験により、分離菌は*Alcaligenes*属細菌と同定された。本菌の最適生育pHは6-7、最適生育温度は50℃であり、中度好熱性細菌であることが明らかとなった。本菌をLB液体培地で培養し、100℃、30分の熱処理をした後、生菌数の割合は、10万分の1のオーダーであった。熱処理後、生存細胞を再び培養し、生菌数の割合を求めた。この操作を3回繰り返しても生

菌数の割合に変化がなかった。したがって熱に順応するということは見られないようである。また細胞濃度を変えて熱処理を行なっても、細胞濃度に関係なく、生菌数の割合は10万分の1のオーダーで一定していた。本分離菌は100℃、60分の熱処理でも死滅せず、強い熱耐性を持つことが示された。

キーワード：好熱性細菌，熱処理，熱耐性

引用文献

- 1) TRENT, J. D., CHASTAIN, R. A. and YAYANOS, A. A.: Possible artefactual basis for apparent bacterial growth at 250°C. *Nature*, **307**, 737-740 (1984)
- 2) BROCK, D. T.: Thermophilic Microorganisms and life at high temperatures, Springer-Verlag, N. Y. (1978)
- 3) MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. and SAMBROOK, J.: Media and antibiotics, Molecular cloning: a laboratory manual, p.68-73, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1982)
- 4) JOHN, J. F. Jr.: Gram stain. *Ann. Intern. Med.*, **129**, 1083 (1998)
- 5) COWAN, S. T. and STEEL, K. J.: Manual for the identification of Medical bacteria, 2ed., Cambridge University Press, London (1974)
- 6) BROCK, D. T. (ed.): Thermophiles, p.2, John Wiley & Sons, N. Y., (1986)
- 7) MARY, J. and REVET, B.: Isolation and characterization of a protein with high affinity for DNA: The glutamine synthetase of *Thermus thermophilus* 111. *J. Mol. Biol.*, **12**, 121-134 (1999)
- 8) ALTINTAS, M. M., OZER, N. and ULGEN, K. O. J.: Purification of *TaqI* endonuclease from *Thermus aquaticus*. *J. Chromatogr. A*, **18**, 373-381 (1998)
- 9) HUANG, H. S., KABASHIMA, T., ITO, K., YIN, C. H., NISHIYA, Y., KAWAMURA, Y. and YOSHIMOTO, T.: Thermostable glycerol kinase from *Thermus flavus*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1382**, 186-190 (1998)
- 10) POND, J. L. and LANGWORTHY, T. A.: Effect of growth temperature on the long-chain diols and fatty acids of *Thermomicrobium roseum*. *J. Bacteriol.*, **169**, 1328-1330 (1987)
- 11) BURROWS, J. A. and GOWARD, C. R. J.: Preparation of DNA polymerase from *Bacillus caldotenax*. *Chromatogr.*, **639**, 75-80 (1993)
- 12) EVANS, T. C. Jr. and BENNER, J. and XU, M. Q. J.: The in vitro ligation of bacterially expressed proteins using an intein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biol. Chem.*, **274**, 3923-3926 (1999)
- 13) de BAKKER, P. I. W., HNNENBERGER, P. H. and MCCANNON, J. A. J.: Molecular dynamics simulations of the hyperthermophilic protein Sac 7d from *Sulfolobus acidocaldarius*: Contribution of salt bridges to thermostability. *Mol. Biol.*, **285**, 1811-1830 (1999)
- 14) MANCO, G., ADINOLFI, E., PISANI, F. M., OTTOLINE, G. and CARREA, G.: Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily. *Rossi. M. Biochem. J.*, **332**, 203-212 (1998)
- 15) GIUFFRE, A., WATMOUGH, N. J., GIANNINI, S., BRUNORI, M., KONINGS, W. N. and GREENWOOD, C.: Electron transfer kinetics of *caa3* oxidase from *Bacillus stearothermophilus*: A hypothesis for thermophilicity. *Biophys. J.*, **4**, 438-442 (1999)
- 16) PALOP, A., MARCO, A., RASO, J., SALA, F. J., CONDON, S.: Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. *Int. J. Food Microbiol.*, **38**, 25-30 (1997)
- 17) RAINEY, F. A., WARD, N. L., MORGAN, H. W., TOALSTER, R. and STACKEBRANDT, E. J.: Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *Bacteriol.*, **175**, 4772-4779 (1993)
- 18) DELVER, E. P., BELOGUROVA, N. G., TUPIKOVA, E. E., VARFOLOMEYEV, S. D. and BELOGUROV, A. A.: Characterization, sequence and mode of replication of plasmid pNB2 from the thermophilic bacterium *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 166-172 (1996)
- 19) DONNELLY, L. S. and BUSTA, F. F.: Heat resistance of *Desulfotomaculum nigrificans* spores in soy protein infant formula preparations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 721-725 (1980)
- 20) INY, D., PINSKY, A. and MALOVANI, H.: The effect of cations on the thermophilic

- character of alkaline phosphatase from *Thermoactinomyces vulgaris*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **29**, 729-737 (1993)
- 21) LEHRER, S. B. and SALVAGGIO, J. E.: Characterization of *Thermoactinomyces sacchari* antigens. *Infect. Immun.*, **20**, 519-525 (1978)
- 22) EMBLEY, T. M., SMIDA, J. and STACKEBRANDT, E.: Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 961-966 (1998)
- 23) CORMIER, Y., ASSAYAG, E. and TREMBLAY, G.: Viral infection enhances lung response to *Micropolyspora faeni*. *Am. J. Ind. Med.* **25**, 79-80 (1994)
- 24) ERDURAN, I. and KOCABIYIK, S.: Amino acid substitutions in the subunit interface enhancing thermostability of *Thermoplasma acidophilum* citrate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 566-571 (1998)