古式泡盛製法シー汁浸漬液中から分離した α -アミラーゼ生産菌の 同定と α -アミラーゼの精製および諸性質

熱田和史, 大城 勤, 塚田太一郎*, 森 哲也*, 角田潔和*, 小泉武夫*

忠孝酒造株式会社

〒 901-0235 沖縄県豊見城市字名嘉地 132 番地

* 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

〒 156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

平成 16 年 7 月 21 日受理

Identification of α -amylase production bacteria isolated from the si-jiru process for
awamori making. Purification and characterization of α -amylase

Kazushi ATSUTA, Tsutomu OSHIRO, Taichirou TSUKADA*, Tetsuya MORI*, Toshitaka KAKUTA*, Takeo
KOIZUMI*

(Cynukou Shuzo Co. Ltd., 132 Nakachi Tomigusuku-shi, Okinawa, 901-0235, Japan

*Department Of Fermentation, Tokyo University of Agriculture 1-1-1 Sakuragaoka, Setagayaku, Tokyo, 156
-8502, Japan

The si-jiru process was performed so that water steeped rice was kept successively, and the water was used in the next steeping process without renewal in traditional awamori production. This process has come to be no longer used because of mechanization and labor saving measures implemented after the 1960 s. It was our aim to elucidate zymuragically and microbiologically that bacteria hydrolyzing starch were isolated from the si-jiru process in traditional awamori production before this time. Three types of bacteria were isolated from si-jiru as follows: one type of *Branhamella* sp., two types of *Neiseria* sp., and one type of *Bacillus* sp. *Bacillus* sp was identified as was *B. subtilis*. α -Amylase produced by *B. subtilis* C-1 was purified by ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography, gel filtration, and HPLC. As the results, the purified protein was 60 kDa with SDS-PAGE and gel filtration, suggesting that the enzyme is a monomer protein. The temperature and pH optima were 40°C and 7.0, respectively. The thermal and pH stabilities were under 40°C and around pH 5-6, respectively. Alphasized Thai rice, and raw Thai rice were hydrolyzed by the enzyme. Metal ions such as Hg^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} strongly inhibited the enzyme activity, but Ca^{2+} enhanced it. The enzyme was inhibited by EDTA but was not inhibited by PCMB. It is considered that the enzyme did not contain any cysteine residue, suggesting that this enzyme is a liquefaction type α -amylase.

Key words: α -アミラーゼ, *Bacillus subtilis*, 泡盛, シー汁浸漬

緒 言

昭和 30 年代以前の沖縄での泡盛製造において原料

米の浸漬は浸漬水を全て取り替えるのではなく、一部を取り置き、次回の浸漬水に加えて、浸漬を繰り返すという作業によって行っていた。さらに浸漬時間も

15 時間から 24 時間にも及び、浸漬時間の経過と共に浸漬水は酸性、粘性及び臭気を帯びてくるものだった。このような浸漬水を用いる浸漬はシー汁浸漬法と呼ばれた。昭和 30 年代後半から泡盛製造の機械化や省力化が進み、この浸漬法は現在では全く用いられなくなった。しかしシー汁浸漬の醸造学的な解明がほとんどなされず、伝承のみが残っているにすぎない¹⁻³⁾。筆者らはシー汁浸漬を醸造学的、微生物学的に解明、復活させるために、これまでにシー汁浸漬過程で、浸漬米のミネラル、ビタミン類、タンパク質等が減少し⁴⁾、多くの微生物群の生産する酵素類が米表層部に作用し、微生物的精白の役割をもつことを明らかにした⁵⁾。本報ではこの浸漬中で原料米に最も影響を及ぼす酵素として、 α -アミラーゼに着目し、本酵素を生産する微生物を分離同定、さらに本酵素を精製して諸性質について調べ、シー汁浸漬における α -アミラーゼの作用について検討した。

実験方法

1. α -アミラーゼ生産菌のスクリーニング

前報⁵⁾と同様にシー汁種を適宜希釈し、下記 3 種類の培地に平板希釈法により塗布した。基本培地としてグルコース 1.0%，ポリペプトン 0.5%，酵母エキス 0.5%，寒天 1.5% を含むもの、これに炭酸カルシウム 0.5% 添加した培地を白亜寒天培地とした。さらに基本培地のグルコースを可溶性デンプン 1.0% に置き換えたものをデンプン培地とした。それぞれ 30°C、24 時間培養後、基本培地に出現したコロニーはランダムに釣菌し、白亜寒天培地およびデンプン培地からはハロー形成の大きいコロニーを選択した。次に釣菌した菌株のデンプン分解能を調べるため、可溶性デンプン 1.0%，酵母エキス 0.5%，ポリペプトン 0.5% を含む液体培地 10 ml に釣菌した菌を 1 白金耳接種し、25°C、48 時間、振とう培養した。培養後、培養液を遠心分離 (5,000×g, 15 min) し菌体を除去した。上清液 0.1 ml をヨウ素溶液 10 ml に加えて発色させ、670 nm における吸光度を測定し、培地のみ 0.1 ml を加えた測定値をブランクとして、メインテストとの差をデンプン分解能とした。デンプン分解能が高い株を選び、 α -アミラーゼ活性を測定した。その中で活性の高い株を選抜株とした。

2. α -アミラーゼ活性測定

α -アミラーゼの測定は Takasaki⁶⁾ の方法に従った。すなわち基質として 2.0% 可溶性デンプン溶液 0.5 ml (pH 7.0) に酵素液 0.5 ml を加え、40°C、10 分間の反応後、生成された還元糖量を Somogyi-Nelson 法⁷⁾ により定量した。なお 1 分間に 1 μ mol の還元糖を生成する力価を 1 Unit とした。

3. α -アミラーゼ生産菌の同定

シー汁浸漬液中から分離した細菌の同定は成書^{8,9)}に従って行なった。供試菌株は、 α -アミラーゼ活性の高い菌株 4 株を用いた。対照菌株として *Bacillus subtilis* (IFO 03009) を用いて形態学的、物理学的性質、各種糖類資化性を調べた。なお *Bacillus* 属と判明した株については種についても同定を試みた。

4. 酵素精製

可溶性デンプン 2%，酵母エキス 1%，ポリペプトン 1% を含む培地 1 l にあらかじめ前培養した供試菌株 5 ml を接種し、30°C、48 時間、振とう培養を行ない、遠心分離 (5,000×g, 15 min) 後、その上清液を粗酵素液とした。粗酵素液は限外濾過 (分子量 10,000) により 200 ml まで濃縮した (Step 1)。濃縮酵素液は 50% 飽和濃度となるよう硫酸アンモニウムを添加し、一晚 4°C にて静置した。生じた沈殿物を遠心分離 (10,000×g, 30 min) により回収し、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) に溶解させた (Step 2)。粗酵素液は予備実験により、pH 6.0 での CM TOYOPEARL 及び pH 8.5 での DEAE TOYOPEARL での吸着、1 M NaCl 溶液による溶出の結果、pH 8.5 においてより効果があったため、以後 pH 8.5 で速やかにカラムクロマトグラフィーによる精製を行うことにした。50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で平衡化させた DEAE-TOYOPEARL 陰イオン樹脂 (カラム径 2.4×45 cm) に吸着させ、0~1 M NaCl (50 mM tris-HCl, pH 8.5) の濃度勾配でグラジエント溶出を行なった (Step 3)。得られた α -アミラーゼ活性画分は、一晚 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で透析を行ない、TOYOPEARL HW-55 (カラム径 0.85×90 cm) にてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。溶出は 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で行なった。各フラクションについて α -アミラーゼ活性を測定した (Step 4)。ゲル濾過クロマトグラフィーにより得られた α -アミラーゼ活性画分は、陰イオン交換体 DEAE-5 PW (径

10×75 mm) を用いた分取高速液体クロマトグラフィー (HPLC, 8020 シリーズ, 東ソー社製) により分画を行った。カラムはあらかじめ 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で平衡化させて、酵素液を吸着させた後、0.3 M から 1 M NaCl 濃度勾配でグラジエント溶出を行ない、 α -アミラーゼ活性画分を得た (Step 5)。

5. タンパク質の測定

タンパク質は Lowry 法¹⁰⁾ により、血清アルブミンを標準タンパク質として用い、測定した。また 280 nm における吸光度¹¹⁾ から測定した。

6. 分子量の測定

酵素の分子量はポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE, 12.5%) および TOYOPERL HW-55 (径 0.85×90 cm) によるゲル濾過クロマトグラフィーにより測定した。タンパク質標準物質はゲル濾過には Bluedextran (2,000 KDa), Alcohol dehydrogenase (150 KDa), Trans ferrin (76 KDa), Glutamic dehydrogenase (53 KDa) (全て SIGMA 社製) を用い、SDS-PAGE には Myosin (250 KDa), β -galactosidase B (150 KDa), Phosphorylase B (100 KDa), Serum albumin (75 KDa), Ovalbumin (50 KDa), Carbonic anhydrase (37.5 KDa) (全て BIO-RAD 社製) を用いた。それぞれの溶出位置から分子量を算出した。

7. 至適温度と温度安定性

精製酵素の至適温度は、反応温度を 20°C~70°C の間で 10°C 毎に設定して測定した。温度安定性は、各設定温度 (20°C~70°C) で酵素液を 30 分間保持した後、直ちに冷却し、40°C で酵素活性を測定した。最も高い活性を 100% として相対活性で示した。

8. 至適 pH と pH 安定性

至適 pH は 1 M McIlvaine 緩衝液 (pH 3.0~6.0), 1 M Phosphate 緩衝液 (pH 7.0), 1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0~9.0) を用いて、緩衝液濃度が 50 mM となるように酵素液に添加し、40°C, 10 分間反応させた。pH 安定性は各緩衝液と同量の酵素液を 40°C, 30 分間保持した後直ちに冷却、40°C, pH 7.0 における活性を測定した。結果は最も高い活性を 100% として相対活性で示した。

9. 基質特異性

酵素の基質特異性は、以下の基質を用いた。可溶性

デンプン (ポテト由来, メルク社製), マルトテトラオース (和光純薬社製), デキストリン (和光純薬社製), デキストラン (和光純薬社製)。 α 化タイ米, α 化日本米および α 化モチ米は、それぞれ米を粉碎 (100 メッシュ) し、10 倍量の水を加え、10 分間の煮沸処理を行なった。また煮沸処理を行わない生米も供試した。各基質濃度は 1.0% とし、pH 7.0 で 40°C, 10 分間反応させた。活性は可溶性デンプンの酵素活性を 100% として、相対活性で示した。

10. 金属イオンの影響

酵素液に最終濃度 1 mM になるように各金属塩を加え、40°C, 30 分間保持した後、酵素活性を測定した。金属塩は ZnCl₂, AlCl₃, CaCl₂, MgCl₂, NiCl₂, HgCl₂, CdCl₂, CuCl₂, KCl, MnCl₂ を用いた。結果は無添加の活性を 100% として相対活性で示した。

11. 阻害剤の影響

阻害剤は以下の試薬により検討した。KCN, *p*-chloromercuri benzoic acid (PCMB), α , α -Dipylidyl, Sodium dodecil sulfate (SDS), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), Iodoacetate を用いた。これらを酵素液に最終濃度 1.0 mM になるように添加し、40°C, 30 分間保持した後、活性を測定した。結果は無添加の活性を 100% として相対活性で示した。

実験結果及び考察

1. α -アミラーゼ生産菌の分離同定

シー汁浸漬液から細菌を分離した結果、基本培地から 18 株、白亜寒天培地から 10 株、デンプン培地から 10 株を得た。これら 38 株の培養液についてヨウ素デンプン反応の消失度を測定し、分解能が 60% 以上の菌株を 8 株選抜した。さらに α -アミラーゼ活性を測定し、高い活性を示した 4 株 (A 13, A 17, A 18, C 1) を選抜し、菌の生理学的性質を調べた。各選抜株の生理学的性質を Table 1 に示した。選抜株 4 株の内 3 株はグラム陰性の球菌、1 株はグラム陽性の桿菌であり、グラム陰性球菌は *Branhamella* 属 (A 13), *Neisseria* 属 (A 17, A 18), 最も α -アミラーゼ活性の高いグラム陽性桿菌 (C 1) は *Bacillus subtilis* と同定した。今までにシー汁種調整液中から多種の菌を分離し⁵⁾, *B. subtilis*, *B. circulans*, *Leuconostoc mesenteroide*, *Lactobacillus bifermetas*, *Lactobacil-*

lus sakei 等を同定しているが、今回 α -アミラーゼ生産する球菌として、新規に *Branhamella* 属、*Neiseria* 属を分離した。一方、生酸菌分離培地（白亜寒天培地）からは数個のコロニーを得たが、 α -アミラーゼ活性は非常に弱く、適度な活性を有する菌は分離されなかった。前報⁹⁾で角田らはシー汁浸漬液中から生酸菌の産出するアミラーゼの存在を示唆しているが、今回の浸漬液中からの分離法では分離することができなかった。

2. 酵素精製および分子量の測定

分離した *B. subtilis* C-1 の生産する α -アミラーゼの精製を行った。精製工程結果を Table 2 に示した。粗酵素を限外濾過，硫酸分画，イオン交換，ゲル濾過，

HPLC による精製を行なうことにより、最終的に 18 倍まで精製され、その収率は 20% であった。また SDS-PAGE により単一バンドであったことから、電気泳動的に均一に精製されたことが認められた。本酵素の分子量はゲル濾過による溶出プロットを Fig. 1 に、SDS PAGE の写真を Fig. 2 に示した。ゲル濾過および SDS-PAGE の相対移動度の算出結果、本酵素の分子量は 60 kDa と推定された。また両測定結果共、同じ分子量であったことから単量体のタンパク質であることが明らかになった。これまで細菌が生産する α -アミラーゼの分子量は 22.5 kDa から 139 kDa まで幅広く報告¹²⁻¹⁶⁾ されているが、本酵素は *Bacillus li-*
cheniformis 由来の耐熱性 α -アミラーゼの分子量

Table 1 The morphological and physiological characteristics of bacteria isolated from si-jiru

	Strain No.				
	A-13	A-17	A-18	C-1	<i>B. subtilis</i> (IF 03009)
Gram stain	—	—	—	+	+
Cell shape	Cocci	Cocci	Cocci	Rod	Rod
Sporulation	—	—	—	+	+
Motility	—	—	—	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	—	—	—	—	—
NO ₃ ⁻ reduction	+	—	—	+	+
Acid from glucose	—	+	+	+	+
Hydrolysis of					
Starch	+	+	+	+	+
Hippurate				—	—
Voges-Proskauer test				+	+
Utilization of citrate				+	+
Growth in 7% NaCl				+	+

+ : Positive

— : Negative

Table 2 The summary of the purification of α -amylase from *Bacillus subtilis* C-1

	Total Activity (Unit)	Total Protein (mg)	Specific Activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture broth	24,990	109.4	228.4	1	100
Ultra filtration	22,609	79.2	285.5	1.25	90
50% (NH ₄) ₂ SO ₄	15,402	18.5	832.5	3.64	62
DEAE-TOYOPEARL	9,444	5.8	1,628.3	7.13	38
TOYOPEARL HW-55	7,746	2.9	2,671.0	11.69	31
HPLC(DEAE-5 PW)	4,988	1.2	4,156.7	18.20	20

Fig. 1 Plots of fraction numbers against logarithms of the molecular mass of proteins on TOYOPEAL HW-55

-) : α -Amylase from *B. subtilis* C-1
 a) : Blue dextran (2,000 KDa)
 b) : Alcohol dehydrogenase (150 KDa)
 c) : Trans ferrin (76 KDa)
 d) : Glutamic dehydrogenase (53 KDa)

62.65 KDa¹⁴⁾ に近い分子量であることが明らかになった。

3. α -アミラーゼの物理化学的性質

精製酵素の至適温度、温度安定性、至適 pH および pH 安定性を Fig. 3 に示した。本酵素は 40°C において活性が最も高かった。また温度安定性については 40°C まで安定であったが、40°C を超えると緩やかに失活、70°C における残存活性は、25% であった。シー汁浸漬時の液温はほとんど外気温と同じであり、最も暑い夏場でも 35°C 以上にはならない。従って、本酵素が 40°C までの熱安定性を持つ事はシー汁浸漬時において十分に活性を保持し、米デンプンに作用することが示唆された。

本酵素の至適 pH は 7.0 であり、酸性領域では pH 5.0 までは 60% 以上の活性を示し、pH 4.0 以下ではさらに 30% 以下まで活性が低下した。アルカリ領域では pH 8.0 以上から 50% 程度まで活性は低下した。pH 安定性は pH 5.0 から 6.0 の弱酸性領域で安定であった。pH 4.0 における残存活性は 60% 以上であったが、pH 3.0 になると急速に失活した。弱アルカリ領域においては残存活性が 60%~40% まで低下

Fig. 2 SDS-PAGE of α -amylase from *B. subtilis* C-1

Standard proteins used were Myosin (250 KDa), β -galactosidase B (150 KDa), Phosphorylase B (100 KDa), Serum albumin (75 KDa), Ovalbumin (50 KDa), Carbonic anhydrase (37.5 KDa).

した。シー汁浸漬液中の pH は浸漬時間の経過とともに低下し、24 時間目では pH 4.2 まで達する。従って本酵素は菌の生育と同時に原料米に作用し始め、浸漬時間の経過により生酸菌が酸を生成し酸性状態に近づくに従い、その作用は弱まると推察した。

4. 基質特異性

精製酵素の各基質に対する作用性を Table 3 に示した。本酵素はマルトテトラオース、デキストリン、デキストランに対して全く反応を示さず、 α 化タイ米、 α 化日本米に対して 60%、58% の活性を示した。このことから本酵素は非還元末端から数分子までの α -1,4-グリコシド結合や α -1,6-グリコシド結合を持つ糖類には作用しないと推察した。またモチ米のようにデンプンがアミロペクチンの場合には作用性が低いことが明らかとなった。また生米に対しても相対活性が 17~18% あり、作用が認められた。*B. subtilis* 由来の生デンプン分解活性を持つ α -アミラーゼは低分子のマルトトリオースの分解性を持つと報告¹⁵⁾ されているが、本酵素はマルトテトラオースには作用しないことから、それとは異なる酵素であると推察した。一方、インディカ米であるタイ米は日本米と比べてアミロー

Fig. 3 The optimum temperature and pH and their stabilities of α -amylase from *B. subtilis* C-1.

Symbol : (○) Effects of temperature activity were determined. The reaction mixture contained 0.5 ml soluble starch in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 ml enzyme. The enzyme was incubated at various temperatures, and relative activities were measured. Symbol : (△) For thermal stability, each enzyme solution was kept at various temperatures for 30 min and the relative activity was measured.

Symbol : (●) Effects of pH on enzyme were determined at 40°C by using the following buffer system : McIlvaine buffer (pH 3-6), Phosphate buffer (pH 7.0), Tris-HCl buffer (pH 8-9). The reaction mixture contained 0.5 ml soluble starch in 50 mM various pH, 0.5 ml enzyme. Symbol : (▲) For pH stability, each enzyme solution was kept at various pH for 30 min and the relative activity was measured.

Table 3 Relative reaction on various substrates of α -amylase from *B. subtilis* C-1

Substrates	Relative activity (%)
Soluble starch	100
Maltotetraose	0
Dextrin	0
Dextran	0
Alpharized Thai rice	60.2
Alpharized Japanese rice	58.1
Alpharized glutinous rice	20.8
Raw Thai rice	18.4
Raw Japanese rice	17.1
Raw glutinous rice	6.5

The reaction mixture contained a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1% various substrates, and an enzyme solution. Enzyme activity was measured at 40°C for 30 min.

ス含有量が多いことから¹⁷⁾, タイ米を用いる泡盛製造においてシー汁浸漬液中でも十分に酵素作用がなされると推察された。

5. 金属イオン及び阻害物質の影響

各種金属イオンに対する影響を Table 4 に示した。本酵素は Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} によって阻害され, 特に Hg^{2+} では残存活性が 15% と少ない値を示した。 Ni^{2+} , Cd^{2+} , K^+ , Mn^{2+} に対しては弱い阻害を示し, Al^{3+} , Mg^{2+} に対してはほとんど影響がなく, Ca^{2+} により活性がやや増加した。 Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} で阻害される α -アミラーゼは *B. subtilis* 由来でも報告⁶⁾ はあるが, 分子量が 25 KDa と本酵素とは異なる。シー汁浸漬は当時ほとんど地下水で行なわれており, 沖縄の地下水は総じて Ca 硬度が高い⁴⁾ ことより本菌株の生産する α -アミラーゼは安定した活性を持つ事が明らかとなった。各種阻害剤の影響の結果を Table 5 に示した。本酵素は EDTA によって阻害され, PCMB,

Table 4 Effects of metal compound on the α -amylase from *B. subtilis* C-1

Metal ion	Relative activity(%)
None	100
AlCl ₃	100
MgCl ₂	100
CaCl ₂	108
NiCl ₂	84
CdCl ₂	79
KC l	78
MnCl ₂	72
CuCl ₂	44
ZnCl ₂	34
HgCl ₂	15

On milliliter of the reaction mixtures contained a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1% soluble starch, and each metal compound (1 mM).

SDS, α , α -Dipyridyl には阻害されないことが明らかになった。福本ら¹⁸⁾ は細菌が生産する α -アミラーゼは液化型と糖化型の 2 種類に分類している。本酵素は Ca²⁺ によって活性が増加し, EDTA によって阻害された。しかし PCMB に阻害を受けない事から, システイン残基を持たず, 液化型酵素¹⁹⁾ のグループであると推察した。

以上よりシー汁浸漬液中から α -アミラーゼ活性の高い菌を分離同定した結果, *Bacillus subtilis* であることが明らかになった。さらに *Bacillus subtilis* C-1 の生産する α -アミラーゼを精製し, 性質を調べた結果, 分子量 60 KDa の単量体タンパク質であり, pH 5.0-6.0 の酸性領域で安定性が認められた。 α 化タイ米, 生のタイ米に対しても活性を示した事, また本株の前培養液をシー汁種の代りに添加し, 24 時間培養した液の α -アミラーゼ活性はシー汁種を添加したシー汁浸漬液の α -アミラーゼ活性の 1/5 を占めることより, シー汁浸漬液中において本株の生産する α -アミラーゼは原料米に対し作用している事が明らかになった。シー汁浸漬液中には今回分離同定された *Bacillus subtilis* C-1 以外にも α -アミラーゼを生産する菌が多く存在することから, これらと共に原料米表層のデンプンを分解しているものと推察した。

Table 5 Effects of various inhibitors on the α -amylase from *B. subtilis* C-1

Inhibitors	Relative activity(%)
None	100
CH ₃ COOH	84
PCMB	98
KCN	80
α , α -Dipyridyl 1	100
SDS	100
EDTA	48

One milliliter of the reaction mixtures contained a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1% soluble starch, and each metal.

要 約

シー汁浸漬液中から 4 株の α -アミラーゼ生産菌の分離及び同定を行ない, 菌の生産する α -アミラーゼを精製しその諸性質を明らかにし, シー汁浸漬における役割について検討した。

①シー汁浸漬液中から α -アミラーゼ高生産菌を分離同定した結果, 3 株については *Branhamella* 属, *Neiseria* 属であることが認められ, 1 株は *Bacillus subtilis* と同定した。

②分離菌 *Bacillus subtilis* C-1 の生産する α -アミラーゼの精製を行った。その結果, 本酵素の分子量は 60 KDa, 単量体, 至適温度 40°C, 温度安定性は 40°C 以下, 至適 pH は 7.0, pH 安定性は pH 5.0—6.0 で安定であった。

③本酵素はタイ米に高い酵素活性を示し, さらに生の米デンプンにも作用する事が明らかになった。

④本酵素は Ca²⁺ によって活性が増加し, PCMB に影響を受けず, EDTA によって阻害を受けた。

以上より, 本菌株及びその生産する α -アミラーゼは, 地下水に含まれる Ca²⁺ により安定した生デンプン分解活性を維持し, 原料米に作用することが示唆された。

文 献

- 1) 森 貞信：醸協, **30**, 817-823 (1935)
- 2) 牛島善人：醸協, **31**, 564-570 (1936)
- 3) 野白喜久雄：醸協, **55** (9), 562-568 (1960)
- 4) 熱田和史, 大城勤, 角田潔和, 小泉武夫：醸協, **98** (1), 59-65 (2003)

- 5) 角田潔和, 金内誠, 熱田和史, 進藤斉, 吉澤淑, 小泉武夫: 醸協, **93** (11), 897-904 (1998)
- 6) Y. TAKASAKI: *Agric. Biol. Chem.*, **49** (4), 1091-1097 (1985)
- 7) 注解編集委員会: 第四回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993)
- 8) 堀込宏明: 最新微生物同定法, 工業技術会, (1994)
- 9) Bergey's manual of Systematic Bacteriology Vol. 2, Wiillams & Wilkins, Baltimore (1986)
- 10) O. H. Lowry, N. J. Rosebroth, A. L. Farr, and R. J. Rondall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-273 (1951)
- 11) 宗川吉汪: 生物工学実験書, 日本生物工学会編, 焙風館 (1992)
- 12) 丸尾文治, 田宮信雄監修: 酵素ハンドブック (第10刷), 朝倉書店, p 493 (1982)
- 13) S. Sen and S. L. Chakarabarty: *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 419-423 (1986)
- 14) F. J. Morgan and F. G. Priest: *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 107-114 (1981)
- 15) S. Hayasida, Y. Teramoto and T. Inoue: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** (6), 1516-1522 (1988)
- 16) J. A. Depinto and L. L. Cambell: *Biochemistry*, **7** (1), 114-120 (1968)
- 17) 石谷孝佑, 藤木正一編集: 米飯食品辞典, サイエンスフォーラム, (1995)
- 18) 福本寿一郎, 岡田茂孝: 醸工, **41** (8), 427-434 (1963)
- 19) T. Yamamoto: Handbook of Amylase and Related Enzymes, The amylase research society of Japan, Pergamon press, Oxford, England, (1988)