ブータン産餅麴チャン・ポーにおける糖化菌の検討

内 村 泰・小 島 陽 一・小 崎 道 雄

(東京農業大学農学部農芸化学科)

平成2年1月31日受理

Studies on the Main Saccharifying Microorganism in the Chinese Starter of Bhutan, "Chang poo"

Microorganisms in Chinese Starters from Asia (Part 2)

Tai UCHIMURA, Youichi KOJIMA and Michio KOZAKI

(Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156)

Filamentous microorganisms isolated from 60 samples of the Chinese starter of Bhutan, "Chang poo", could be divided into 3 groups :

- (1) genus *Saccharomycopsis*-dominant group,
- (2) mold (mainly genus *Rhizopus*)-dominant group, and
- (3) filamentous yeasts and molds coexisting group.

Molds isolated were identified as *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. The amylase activity test on molds and "Chang poo" showed that only 5 strains of *Rhizopus* sp. and 1 strain of *Aspergillus* sp. among 15 isolated strains produced amylase. Since other strains showed low amylase activity, it was not likely that all molds isolated from the Chinese starter were concerned in amylase production. Although an isolated strain *Rhizopus* sp. M22 had high amylase activity, its value was lower than that of the genus *Saccharomycopsis*.

These findings would support the previous reports that *Saccharomycopsis* played the main role in amylase production. Thus, the main saccharifying microorganism in Chinese starter of Bhutan, "Chang poo" was *Saccharomycopsis fibuligera*, and molds belonging to genera *Rhizopus* and *Aspergillus* seemed to supplement the saccharification.

Key words : ブータン・チャンポー・餅麴

緒 言

Saccharomycopsis 属酵母の生産するアミラーゼの研究は, SAITO¹⁾, 長西²⁾, WICKERHAM ら³⁾によってその存在が報告され, HATTORI⁴⁻⁶⁾ は *Endomyces* sp. IFO 0111 のグルコアミラーゼについて報告し, FUKUI, NIKUNI ら⁷⁾はこの酵素を精製・結晶化している。

また福本, 辻坂ら^{8,9)}は広くアミラーゼ給源を不完全菌に求め, *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0108 の α -アミラーゼについて報告している。

著者ら^{10,11)}は, 餅麴の微生物は糸状菌として *Rhizopus cohnii*, *Mucor circinelloides* が, 酵母では *Saccha-*

romycopsis fibuligera, *Saccharomyces cerevisiae* および乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* が棲息していることと併せて, 餅麴を用いて酒造りを行う場合, 酵母の *Saccharomycopsis fibuligera* がアミラーゼ生産を行う主糖化菌であろうと報告した。

当研究室で検討した *Saccharomycopsis fibuligera* の生産するアミラーゼは, α -およびグルコアミラーゼの2種類の酵素学的性質を異にするアミラーゼを, 高単位に生産するという菌学的にも興味深い結果を得ている¹²⁾ことから, この実証とともに本報告ではさらに, 高単位にアミラーゼ生産を行う *Saccharomycopsis fibuligera* の検索を目的に, これまで入国が困難であったため, 微生物学的研究が全く行われていなかったヒマラヤ山中のブータン王国¹³⁾にその給源をもとめた。

アジアにおける穀類麴とその微生物に関する研究
(第2報)

実験方法

1. アミラーゼ生産糸状菌の検索

1-1 試料

Table 1 に示したチャン・ポー 59 試料，北インドの餅麴バカル 1 試料を示した。

1-2 餅麴より直接分離

分離培地は YPSA 寒天培地（可溶性でん粉 1.0%，ペプトン 0.5%，酵母エキス 0.3%， K_2HPO_4 0.1%，クロラムフェニコール 50 ppm，ペニシリン G 100 ppm，ストレプトマイシン 100 ppm，pH 5.6），PDA 寒天培地（ポテトエキス 20.0%，グルコース 2.0%，クロラムフェニコール 50 ppm，ペニシリン G 100 ppm，ストレプトマイシン 100 ppm，pH 5.6），SMA 寒天培地（可溶性でん粉 1.0%，L-Asparagine 0.2%， K_2HPO_4 0.05%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0025%， $FeCl_3$ 1.0 mg%，Thiamin-HCl 0.2 mg%，クロラムフェニコール 50 ppm，ペニシリン G 100 ppm，ストレプトマイシン 100 ppm）を用い常法通り混釈法により分離を行った。

培養条件は 30℃ で 48～72 時間行い，出現したコロニーの形状によって，真菌を *Saccharomycopsis* 属菌糸状酵母と糸状菌に分けた。

生菌数は 1 g の餅麴から出現したコロニー数で表した。

1-3 餅麴による蒸煮米の糖化と糖化菌の分離

1-2 で出現した菌種が，必ずしもでん粉の糖化を優勢に行っているか判断できないため，集積培養を兼ねて餅麴による蒸煮米の糖化試験を行い，併せて菌の分離を行った。300 ml 三角フラスコに，洗米，浸漬（一晚），水切り（3 時間）した米 50 g と等量の水 50 ml を加え，120℃，30 分オートクレーブで炊飯および殺菌を行った。その後さらに殺菌水 25 ml とチャン・ポーの粉末 0.5 g を加え，30℃ で 4 日間糖化および発酵を行わせた。

菌の分離は，糖化および発酵の終了した時点で 1-2 と同様希釈平板法により生菌数を計測した。

2. 糸状菌の同定

カビの分類と同定¹⁴⁾および *Mucorales*¹⁵⁾ に従い，培養は PDA 培地を用いて巨大コロニー，およびスライドカルチャー法による観察により属の検索を行った。

3. 分離糸状菌およびチャン・ポーの酵素活性

3-1 供試餅麴と供試菌株

供試餅麴：No. 7, 22, 23, 24, 29, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 43, 55, 57

供試糸状菌：M 2, M 4, M 6, M 10, M 22, M 38, M 43, M 47-1, M 47-2, M 55-1, M 55-2, M 56-1, M 56-2, M 57, M 59 の 15 株

酵素活性の比較菌としてチャン・ポーより分離した，*Saccharomycopsis fibuligera* C-33 株を用いた。

3-2 ふすま培地の作製

三角フラスコにふすま：水＝4：1（v/v）になるように作製したもの 10 g を入れ，オートクレーブ殺菌した。

これに供試菌 1 白金耳，あるいは餅麴 0.5 g を接種し 30℃ で 96 時間静置培養した。

3-3 酵素液の調整

3-2 で作製したふすま培地に培養後，0.5% NaCl を含む 100 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）50 ml を加え，3 時間抽出後，東洋濾紙 GC-90 で吸引濾過した。

この濾液を流水中で 1 晩透析したものを，酵素液として用いた。

3-4 糖化（Saccharifying）活性の測定

1.0% 可溶性でん粉溶液 2.5 ml に 100 mM 酢酸緩衝液 2.0 ml を加え，40℃ で 5 分予熱後，酵素液 0.5 ml を加えてさらに 40℃ で 10 分反応させた。

反応後その反応液を 1.0 ml 採り，Somogyi-Nelson 法によりグルコースとして還元糖を測定した。活性単位は，1 分間に生成されるグルコース μmol を 1 unit とし，空試験には熱失活酵素を用いた。

3-5 糊精化（Dextrinizing）活性

ヨウ素呈色法および FUWA¹⁶⁾ の方法を一部改変して用いた。

Table 1 Name of districts and number of Chang poo samples.

Districts	No. of samples	Districts	No. of samples	Districts	No. of samples
Paro	8	Lhutsi	1	Mongar	2
Tongsa	7	Kurteminji	3	Thimphu	3
Bumtang	5	Kurteparchu	2	Punakha	1
Tangbee	1	Kurtetamachu	1	Lunana	1
Ngalhakhang	1	Tashiyangts	1	Seyohu	1
Tangkhangrap	2	Faranlingkar	1	Dur	1
Tangugenchree	2	Yamatchen	2	Lingsh	1
Unkar	1	Sangcolor	3	Jangtang	2
Jarogang	1	Tashigang	1	Darjeeling	1
Manjalee	1	Kanglung	1	(Bakar : India)	
Takila	1	Yadi	1	《Total》	60

2.0% 可溶性でん粉溶液 0.5 ml と 100 mM 酢酸緩衝液 0.4 ml を混合し、40°C で 5 分間予熱後酵素液 0.1 ml を加え、40°C、10 分間反応させた。反応後、N/10 塩酸 9.0 ml を加え反応を停止させ、この反応液 0.5 ml、0.005% I_2 -0.05%KI 溶液に加え、その呈色を OD₆₆₀ で測定した。

この条件下、ヨウ素でん粉呈色を 10% 減少させる酵素活性を 1 unit とし、空試験には熱失活酵素を用いた。

3-6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

WILLIAMS¹⁷⁾ の報告した pH 8.0、7.0% ポリアクリルアミドゲルを用い、0.5×10 cm のカラムで 1 本当たり 2 mA の通電による定電流電気泳動を行った。

泳動終了後、タンパク質染色は CHRAMBACH¹⁸⁾ らの方法で、また活性染色は銅染色により行った。

4. アミラーゼ生産菌糸状酵母の検索

4-1 試料および分離方法

Table 1 に示した 60 試料を、希積分離法により行った。

培地は YPSA 培地を用い、30°C、48 時間培養した。

4-2 第一次スクリーニング

YPS 培地（可溶性でん粉 2.0%，ペプトン 0.5%，酵母エキス 0.3%，K₂HPO₄ 0.1%）8 ml に分離菌を 1 白金耳接種し、試験管振とう培養機で 30°C、300 rpm、96 時間培養した。

培養終了後 550×G（3,000 rpm）で 30 分間遠心分離し、その上澄液を酵素液として糖化活性を測定し、1 試料中の中から活性の強い 10 菌株程度を選択することで第一次スクリーニングとした。

4-3 第二次スクリーニング

第一次スクリーニングで選択した株の前培養液 0.2 ml を新鮮 YPS 培地 20 ml に接種し、ロータリーシェーカーで 30°C、180 rpm、96 時間培養した。

培養終了後 14,000×G（10,000 rpm）で 20 分間遠心分離し、その上澄液を一晩流水中で透析したものを酵素液とした。

この酵素液を用いて、アミラーゼ活性（糖化活性、糊精化活性）、各比活性および S/D 比を算出した。

糖化活性で 5 units 以上の菌株を第二次スクリーニングとして選択した。

またタンパク質の測定は、OD₂₈₀ と OD₂₆₀ の差による紫外外部吸収法により測定した。対照菌株として下記の 5 株を用いた。

Saccharomycopsis fibuligera IFO 0103

Saccharomycopsis fibuligera IFO 0111

Saccharomycopsis fibuligera IFO 1665

Saccharomycopsis fibuligera TUA 306 Y

Saccharomycopsis fibuligera R 18

5. 酵母の同定

5-1 供試菌株と同定試験

得られた 7 菌株 C 7、22、23、24、29、33、39 について検討を加えた。

標準菌として *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0103 を用いた。

形態学的試験、生理学的試験は、The yeasts¹⁹⁾ 第 3 版の分類同定法に従った。

結果および考察

1. 餅麴より直接分離

結果を Table 2 に示した。60 試料は構成微生物により次の 3 グループに分けられた。

さらにその中から選択した 14 試料について、各培地を用いた時の希積分板による生菌数の比較を Table 3 に示した。

A : *Saccharomycopsis* 属酵母優勢型 No. 7、22、23、

Table 2 Grouping of Chang poo by dominant microorganisms.

	No. of samples
1) Filamentous yeasts	25
2) Molds	14
3) Molds and filamentous yeasts	15
4) Unknown	6

Table 3 Microflora of Chang poo.

Sample No.	Filamentous yeast			Molds		
	YPSA	PDA	SMA	YPSA	PDA	SMA
7	1.5×10 ⁸	4.4×10 ⁸	2.5×10 ⁵	5.0×10 ⁷	1.0×10 ¹⁰	5.0×10 ⁸
22	5.0×10 ⁴	5.5×10 ⁴	0	2.0×10 ⁴	5.0×10 ³	5.0×10 ³
23	1.0×10 ⁷	5.0×10 ⁶	0	1.0×10 ⁵	5.0×10 ⁵	1.0×10 ⁵
24	2.0×10 ⁸	8.0×10 ⁷	0	2.5×10 ⁴	5.0×10 ⁵	2.0×10 ⁴
29	1.5×10 ⁷	2.0×10 ⁶	3.5×10 ⁹	2.5×10 ⁵	5.0×10 ⁵	1.5×10 ⁹
32	1.0×10 ⁴	1.0×10 ⁵	5.0×10 ³	2.0×10 ³	5.0×10 ³	2.5×10 ⁴
33	4.0×10 ⁵	5.0×10 ⁵	0	5.0×10 ⁶	2.0×10 ⁴	1.5×10 ⁴
34	3.5×10 ⁸	7.5×10 ⁸	0	5.0×10 ⁶	1.0×10 ⁸	5.0×10 ⁵
35	1.1×10 ⁵	6.5×10 ⁴	4.9×10 ³	3.0×10 ⁴	5.0×10 ⁴	1.0×10 ⁴
37	1.1×10 ⁹	5.5×10 ⁸	1.0×10 ⁷	5.0×10 ⁷	2.5×10 ⁷	5.5×10 ³
38	1.5×10 ⁷	1.0×10 ⁷	0	2.0×10 ⁶	2.5×10 ⁶	1.5×10 ⁵
43	1.5×10 ⁷	5.0×10 ⁷	5.5×10 ⁶	1.9×10 ⁷	8.5×10 ⁷	1.0×10 ⁹
55	1.5×10 ⁶	5.0×10 ⁷	2.5×10 ⁹	5.0×10 ⁶	9.0×10 ⁸	0
57	7.5×10 ⁵	6.0×10 ⁵	1.3×10 ⁴	1.5×10 ⁸	2.5×10 ⁸	5.0×10 ⁸

YPSA medium : Soluble starch 1.0%, Pepton 0.5%, Yeast extract 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, Chloramphenicol 50 ppm, Penicillin G 100 ppm, Streptomycin 100 ppm

PDA medium : Potato extract 20.0%, Glucose 2.0%, Chloramphenicol 50 ppm, Penicillin G 100 ppm, Streptomycin 100 ppm

SMA medium : Soluble starch 1.0%, L-Asparagin, K₂H₂PO₄, MgSO₄·7H₂O 0.025%, FeCl₃ 1.0 mg%, Thiamine·HCl 0.2 mg%, Chloramphenicol 50 ppm, Penicillin G 100 ppm, Streptomycin 100 ppm

24, 29, 33
 B : *Rhizopus* 属中心の糸状菌優勢型 No. 32, 34, 35,
 43, 55, 57

C : 菌糸状酵母と糸状菌共存均衡型 No. 37, 38

これら 3 グループに分類されたチャン・ポーも希釈平板を行うことにより、全試料中から *Saccharomycopsis* 属酵母と *Rhizopus* 属中心の糸状菌が共存することが確認された。また PSA 培地と PDA 培地を用いて *Saccharomycopsis* 属酵母と糸状菌の生菌数を比較してみると、No. 7, 22, 23, 29, 32, 33, 34, 35, 38, 43, 55 の試料で *Saccharomycopsis* 属酵母と糸状菌の生菌数はほぼ同数であった。

試料 No. 23, 24, 37 では、*Saccharomycopsis* 属酵母の菌数が糸状菌の菌数より 10^2 倍程度多く、これらの餅麴中では *Saccharomycopsis* 属酵母が優勢であると考えられた。

また No. 57 では、糸状菌の生菌数が *Saccharomycopsis* 属酵母より 10^3 程度多く、この試料では糸状菌が優勢であると思われた。

2. 餅麴による蒸煮米の糖化と菌の分離

チャン・ポーを蒸煮米に接種し、糖化を行わせた試料から希釈平板法で分離した結果を Table 4 に示した。

No. 7, 22, 23, 34, 35 からは、*Saccharomycopsis* 属酵母のみが $10^5 \sim 10^6$ 程度出現し、No. 24, 29, 32, 33, 38 では菌糸状酵母および糸状菌が両者ともに $10^5 \sim 10^6$ 程度出現していた。

また No. 37, 43, 55, 57 では、*Rhizopus* と思われる糸状菌のみが出現した。特に、No. 55, 57 は 10^{11} 程度の生菌数が計数されたことから、この 2 試料は糸状菌優勢型の餅麴と考えられた。しかしながらこれら 2 試料に

Table 4 Microbial population of steamed rice inoculated with Chang poo.

Sample No.	Filamentous yeast			Molds		
	YPSA	PDA	SMA	YPSA	PDA	SMA
7	1.6×10^6	8.0×10^5	0	0	0	0
22	5.0×10^5	8.0×10^5	0	0	0	0
23	6.0×10^5	0	0	0	0	0
24	2.0×10^5	0	0	1.0×10^5	0	1.0×10^5
29	5.4×10^6	5.0×10^5	0	0	0	1.0×10^5
32	6.2×10^7	7.1×10^7	0	0	1.0×10^6	0
33	1.0×10^5	0	0	0	1.0×10^5	0
34	5.3×10^6	0	0	0	0	0
35	4.3×10^6	0	0	0	0	0
37	0	0	0	4.7×10^5	0	0
38	1.4×10^6	6.0×10^5	0	1.5×10^6	1.4×10^5	1.7×10^5
43	0	0	0	4.0×10^5	3.0×10^5	3.0×10^5
55	0	0	0	0	2.3×10^{11}	2.5×10^{11}
57	0	0	0	1.1×10^{11}	1.3×10^{11}	1.0×10^{11}

Microbial analysis was done after 4 days incubation at 30°C (colonies/g)

Table 5 Results of identifying molds isolated from Chang poo samples.

<i>Rhizopus</i> sp.	M4, M6, M10, M22, M38, M43, M47-1, M47-2, M55-1, M55-2, M57, M59
<i>Aspergillus</i> sp.	M56-2
<i>Penicillium</i> sp.	M2, M56-1

よる蒸煮米の糖化は、他試料を用いて糖化を行ったものに比べて非常に弱いものであった。

3. 糸状菌の同定

チャン・ポーのグループ分けの際分離した糸状菌 15 株について、属の同定を行いその結果を Table 5 に示した。

15 株のうち M2 株は conidial head の形状から *monoverticillata* の *Penicillium* sp. と同定した。

M56-1, M56-2 は分生子頭の形状および分生子が黒色であることから、Niger group に属する *Aspergillus* sp. と同定した。

他の 12 株は sporangium 形状が球状、rhizoid および stolon の存在から *Rhizopus* sp. と同定した。

4. 糸状菌およびチャン・ポーのアミラーゼ活性

糸状菌のアミラーゼ活性の結果を Table 6 に示した。

分離菌 15 株のうち、アミラーゼを生産していたものは *Rhizopus* sp. M4, 6, 22, 47-1, 47-2 と *Aspergillus* sp. M56-2 の 6 菌株のみであった。

特に *Rhizopus* sp. M6, 22, 47-1 の 3 株はアミラーゼ活性が高く、S/D 比より、*Rhizopus* sp. M4 株は

Table 6 Amylase activity of molds isolated from Chang poo samples.

strains	S. A* units	D. A** units	S/D
<i>Rhizopus</i> sp.			
M4	2.65	21.48	0.21
M6	8.37	23.47	0.36
M10	ND	ND	ND
M22	9.67	32.36	0.30
M38	1.38	ND	—
M43	0.68	0.74	0.92
M47-1	6.71	0.33	20.33
M47-2	3.49	14.04	0.25
M55-1	ND	ND	ND
M55-2	0.77	ND	—
M57	0.60	ND	—
M59	1.05	0.37	2.84
<i>Aspergillus</i> sp.			
M56-2	2.95	2.19	1.35
<i>Penicillium</i> sp.			
M2	0.64	ND	—
M56-1	0.36	ND	—
<i>S. fibuligera</i>			
C33	14.71	128.51	0.11
R18	4.35	0.81	5.37

S. A* : Saccharifying activity

D. A** : Dextrinizing activity

0.12 となり α -アミラーゼが強く、M 47-1 株は 20.33 とその活性の大部分がグルコアミラーゼであることを示していた。

他の *Rhizopus* sp. M 6, 22, 47-2 では S/D 比は 0.25~0.36 と各菌株間には近い値を示した。

また、*Aspergillus* sp. M 56-2 の S/D 比は 1.35 であった。

他の 9 菌株のアミラーゼ活性はきわめて弱かった。

このことから餅麴より分離される糸状菌すべてが、必ずしもアミラーゼ生産に関与しているとは考えられなかった。

この *Rhizopus* sp. M 22 株は得られた糸状菌の中ではアミラーゼ高生産菌であったが、*Saccharomycopsis fibuligera* C 33 株のアミラーゼは、その活性を上回っていたことから、これまで報告してきた *Saccharomycopsis* 属酵母がアミラーゼ生産を行う主糖化菌であることを支持する結果となった。

また S/D 比が 0.11 であることから α -アミラーゼを高生産している菌株と思われる。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動による糖化酵素の比較

チャン・ポーの酵素液を用いて行った PAGE の結果を Fig. 1 に示した。

比較対照として *Rhizopus* sp. M 22 株、*Aspergillus* sp. M 56-2 株、*Saccharomycopsis fibuligera* C 33 株を用いた。

供試したすべてのチャン・ポー No. 7, 22, 23, 29, 32, 33, 34, 35, 37, 43, 55, 57 において、*Saccharomycopsis fibuligera* C 33 株のものと同じ位置に、同様の 3 本の活性バンドを有していた。

Fig. 1 Electropherogram of amylase produced by microorganisms in Chang poo samples on polyacrylamide gel at pH 8.0.

Left ; ; Right
Rhizopus sp. M 22, *Aspergillus* sp. M 56-2, *S. fibuligera* C 33, No. 32, 35, 43, 55, 57

In a pair of gel, one of left was stained with Coomassie Brilliant Blue, another of right was treated with Somogyi reagent.

No. 32 は *Saccharomycopsis fibuligera* の活性バンドと、*Aspergillus* sp. M 56-2 株と同様のバンドがみられたことから、この試料中では糖化菌として *Saccharomycopsis fibuligera* および *Aspergillus* sp. が糖化機能を担っているものと考えられた。

また、*Rhizopus* 属中心の糸状菌優勢型と考えられたチャン・ポー No. 55, 57 においても *Saccharomycopsis fibuligera* と同様のアミラーゼ活性バンドを示していた。

さらに No. 57 は *Saccharomycopsis fibuligera* の持つ活性バンドのほか、他の微生物による活性バンドが示されたことから、これら両者が糖化機能に関与しているものと思われた。

以上のことから、ブータンの餅麴チャン・ポーの主糖化菌は *Saccharomycopsis fibuligera* であり、補足的に *Rhizopus* sp. や若干の *Aspergillus* sp. などの糸状菌が、糖化に関与しているものと考えられた。

6. 第一次および第二次スクリーニング

菌の分離はチャン・ポー 60 試料より 679 株を得、第一次スクリーニングにより 110 株を取得した。

得られたこれら 110 株を再分離し、二次スクリーニングにより以下の 7 株を選択した。

C 7 : Bumthang, C 22 : Kurteminji,
C 23 : Kurteminji, C 24 : Kurteparchu,
C 29 : Faranlingkar, C 33 : Sangcolor,
C 38 : Mongar

これから 7 株は *Saccharomycopsis* 属酵母優勢型のチャン・ポーから取得されたものである。この 7 株の酵素液を用いて、アミラーゼ活性（糖化活性、糊精化活性）、各比活性および S/D 比を算出し、その結果を Table 7 に示した。

表に示したようにこれら 7 株は、その S/D 比から α -アミラーゼ高生産性の菌株であると考えられた。

Table 7 Results of the secondary screening.

strain	S. A** units	spec. S. A (units/ mg)	D. A*** units	spec. D. A (units/ mg)	protein (mg/ ml)	S/D
C-7	5.68	5.26	69.46	64.31	1.08	0.08
C-22	6.11	5.61	84.08	77.14	1.09	0.07
C-23	6.15	5.91	93.04	89.46	1.04	0.07
C-24	5.75	5.81	87.84	88.73	0.99	0.07
C-29	5.16	5.80	63.94	71.84	0.89	0.08
C-33	8.83	8.41	112.22	106.88	1.05	0.08
C-38	6.06	5.72	73.44	69.28	1.06	0.08
I FO 0103*	7.87	7.29	104.88	97.11	1.08	0.08
TUA 306Y*	4.04	1.97	42.32	20.64	2.05	0.10
I FO 0111*	13.29	14.29	3.56	3.83	0.93	3.73
R-18*	12.54	16.08	1.70	2.18	0.78	7.38

* : *Saccharomycopsis fibuligera*

** : S. A ; Saccharifying activity

*** : D. A ; Dextrinizing activity

Table 8 Morphological characteristics of yeasts.

Sample & strain No.	Vegetative cells	Vegetative reproduction	Pseudo-mycelia	True mycelia	Blastospore	Ascospore	Pellicle
C-7	oval	multilateral budding	+	+	+	hat shaped	-
C-22	oval	multilateral budding	+	+	+	hat shaped	-
C-23	oval	multilateral budding	+	+	+	hat shaped	-
C-24	oval	multilateral budding	+	+	+	hat shaped	-
C-29	oval	multilateral budding	+	+	+	hat shaped	-
C-33	oval	multilateral budding	+	+	+	hat shaped	-
C-38	oval	multilateral budding	+	+	+	hat shaped	-
I FO 0103*	oval	multilateral budding	+	+	+	hat shaped	-

 *: *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0103 (Type strain)

Table 9 Physiological characteristics of yeasts.

Sample & strain No.	Fermentation						Assimilation													
	Glu	Gal	Suc	Mal	Lac	Raf	Gal	Suc	Mal	Lac	Raf	Mel	St	Rha	Ery	Man	Cit	I	NO ₃	Ety
C-7	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	±	-	+	-	-	+w	-	±	-	+w
C-22	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+s	-	+	-	-	+w	-	±	-	+w
C-23	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	±	-	+	-	-	±	-	±	-	+w
C-24	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+s	-	+	-	-	+w	-	±	-	+w
C-29	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+s	-	+	-	-	+w	-	±	-	+w
C-33	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+s	-	+	±	-	+w	-	±	-	+w
C-38	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+s	-	+	-	-	+w	-	+	-	+w
I FO 0103*	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	±	-	+	±	-	+w	-	±	-	+w

Glu: glucose, Gal: galactose, Suc: sucrose, Mal: maltose, Lac: lactose, Raf: raffinose, Mel: melibiose, St: soluble starch, Rha: L-rhamnose, Ery: erythritol, Man: D-mannitol, Cit: citric acid, I: inositol, NO₃: KNO₃, Ety: ethylamine-HCl, +: positive, +w: weakly positive, +s: slow positive, -: negative, ±: positive or negative

分離された7株は α -アミラーゼ生産菌である対照株, *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0103, IFO 1665, TUA 306 Y と S/D がほぼ一致していたことから, 同様のアミラーゼ構成であることが示唆された。

一方, グルコアミラーゼ高生産性菌である他の対照株 *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111, *Saccharomycopsis fibuligera* R 18 と同様の菌株は今回の分離からは得られなかった。

また取得した7菌株中で C 33 株は糖化活性, 糊精化活性の両者において対照とした菌株よりも高い活性を示し, 優れたアミラーゼ生産菌であった。

7. 酵母の同定

Table 8 および Table 9 に結果を示した。7菌株はすべて The yeasts 第3版の記載, および対照とした *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0103 の性質と一致することから, *Saccharomycopsis fibuligera* と同定した。

要 約

1. 構成微生物により次の3グループに分けられた。

A: *Saccharomycopsis* 属酵母優勢型

B: *Rhizopus* 属中心の糸状菌優勢型

C: 菌糸状酵母と糸状菌共存均衡型

これら3グループに分類されたチャン・ポーも希釈平板を行うことにより, 全試料中から *Saccharomycopsis*

属酵母と *Rhizopus* 属中心の糸状菌が共存することが確認された。

2. 糸状菌優勢型の餅麴を用いて蒸煮米の糖化を行ってみたが, 他の餅麴試料を用いて糖化を行ったものに比べて非常に弱いものであった。

3. 糸状菌およびチャン・ポーのアミラーゼ活性を試験した結果, 分離した15株の菌株のうち, アミラーゼを生産していたものは *Rhizopus* sp. の5株と *Aspergillus* sp. 1株の計6菌株のみであった。

他の菌株のアミラーゼ活性はきわめて弱かったことから, チャン・ポーより分離される糸状菌はそのすべてが必ずしもアミラーゼ生産に関与しているとは考えられず, チャン・ポーの主糖化菌は *Saccharomycopsis fibuligera* であり, *Rhizopus* sp. や, 若干の *Aspergillus* sp. などの糸状菌が, 補足的に糖化に関与しているものと考えられた。

以上のことから, これまで報告してきた *Saccharomycopsis* 属酵母がアミラーゼ生産を行うの主糖化菌であることを支持する結果となった。

同行を許可された田部井淳子氏を隊長とするブータン遠征女子登山隊に感謝します。

文 献

1) K. SAITO: Report of the Central Laboratory,

- Dairen, No. 1, 1 (1914)
- 2) 長西廣輔：満鉄中央研究所報告, 14, 231 (1929)
- 3) L. J. WICKERHAM : *J. Bacteriol.*, 48, 413 (1944)
- 4) Y. HATTORI : *Agric. Biol. Chem.*, 25, 737 (1961)
- 5) Y. HATTORI & I. TAKEUCHI : *Agric. Biol. Chem.*, 25, 895 (1961)
- 6) Y. HATTORI & I. TAKEUCHI : *Agric. Biol. Chem.*, 26, 316 (1962)
- 7) T. FUKUI & Z. NIKUNI : *Agric. Biol. Chem.*, 33, 884 (1969)
- 8) 福本寿一郎, 辻坂好夫, 荒木万理子：科学 と 工業, 34, 423 (1960)
- 9) 福本寿一郎, 辻坂好夫, 荒木万理子：科学 と 工業, 35, 412 (1961)
- 10) 小崎道雄, 内村 泰：醸協, 85, (11) 818 (1990)
- 11) 内村 泰, 岡田早苗, 小崎道雄：インドネシア産餅麴ラギの乳酸菌, 醸協 (投稿中)
- 12) 村山 力：東京農業大学学位論文, (1981)
- 13) 内村 泰：食品と低温, 11, 87 (1985)
- 14) 宇田川俊一, 室井哲夫：カビの分離・培養と 同定, 医歯薬出版 (1983)
- 15) H. ZYCHA & R. SIEPMANN : *Mucorales*, Verlag-von J. Cramer (1969)
- 16) H. FUWA : *J. Biochem.*, 41, 583 (1954)
- 17) D. E. WILLIAMS & R. A. REISFELD : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 373 (1964)
- 18) A. CHRAMBACH : *Anal. Biochem.*, 15, 544 (1966)
- 19) N. J. W. KREGER-VAN RIJ : "The Yeasts, A Taxonomic Study", Third revised and enlarged edition, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1984)