

Ganoderma lucidum No. 15 の産生する アミラーゼの精製とその性質

大野 信子, 藤井 貴明

(千葉大学園芸学部)

平成2年9月5日受理

Purification and Properties of Amylase Produced by *Ganoderma lucidum* No. 15

Nobuko OHNO and Takaaki FUJII

Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271

A starch-saccharifying enzyme, amylase, extracellularly produced by *Ganoderma lucidum* No. 15 was purified to homogeneity by CM-cellulose chromatography and gel filtration on Bio-gel P-150 and Toyopearl HW 55F, and its properties were examined. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 53,000 by gel filtration and 54,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, indicating that it is monomeric. The optimum pH for its activity was 5.0. The optimum temperature was 50°C. The enzyme was stable within the range of 0–40°C and pH 4.0–9.0. Its isoelectric point was 6.8. The K_m value for soluble starch was 0.83%. The enzyme was capable of hydrolyzing some raw starches but potato. In the case of wheat and corn starches, the starch-digesting rates were about 18.6 and 16.6% of those of cooked starches, respectively. The enzyme was suggested to be glucoamylase because it produced only glucose from starch.

(Received September 5, 1990)

Keywords: amylase アミラーゼ, cooked starch 糊化でん粉, raw starch 生でん粉, glucoamylase グルコアミラーゼ, enzyme activity 酵素活性, *Ganoderma lucidum* レイシ.

1. 緒 言

これまでに、担子菌類が発酵生産のために利用されることはきわめて少なかったが、近年、担子菌を利用して種々の生産物の報告がなされるようになってきている。酵素生産に関してみれば *Polyporus versicolor*, *Trametes sanguinea*, *Irpex lacteus* などをはじめとする菌株でプロテアーゼ、セルラーゼ、アミラーゼのような多糖類加水分解酵素、ラッカーゼのような酸化還元酵素等の報告が見られる^{1)~9)}。さらに、*I. lacteus*, *T. ostreiformis* などにおいて、凝乳酵素であるレンネット代替酵素の生産に関する研究もなされている^{10)~12)}。また、*Polyporaceae* (サルノコシカケ科)に属するものの中に溶菌酵素を生産するものがあり、これはプロテアーゼやグルカナーゼなどの協同作用の効果によるもので、本酵素は細菌よりも酵母、糸状菌によく作用することが明らかにされてい

る¹³⁾。

担子菌のアミラーゼに関して、最近、*Corticium rolfsii* AHU9627 の生産する酵素が生でん粉を高温、低 pH で効率よく糖化する性質をもっていることが、明らかにされている¹⁴⁾¹⁵⁾。われわれも、本菌が生成するアミラーゼに関して、その生産性向上のために野生株に変異処理を行い、得られた変異菌株について若干の検討を加えてきた¹⁶⁾。しかしながら、本菌の酵素はいまだ精製されておらず、その酵素化学的性質の詳細については明らかにされていない。

以上のように担子菌類は、酵素給源として興味深い対象と考えられる。そこで、われわれはこれまでの報告から判断して、酵素生産株として有望なものが多く含まれているのではないかと考えられる。サルノコシカケ科に属するものを中心に菌株の検討を行い、*Ganoderma lu-*

cidum No. 15 に関して、その生成するでん粉分解酵素について人工培養条件を検討してきた¹⁷⁾。本菌はその子実体がレイシ（靈芝）と呼ばれ、古くからその薬効が知られているものであり、とくに最近では制ガン活性の多糖と苦味成分についての研究が進展し¹⁸⁾⁻²¹⁾、その人工培養についても関心もたれているものである。

本報告は、*Ganoderma lucidum* No. 15 が細胞外に産生するアミラーゼを精製し、その酵素化学的諸性質について検討を加えたものである。

2. 実験方法

(1) 使用菌株とその保存方法

供試菌株は、東京医科歯科大学教養学部生物学研究室より分与された *Ganoderma lucidum* No. 15 株を用いた。

菌株はポテト-デキストロース寒天斜面培地を用い、28℃ で7~10日静置培養を行い、4℃ の低温室中で保存した。保存菌株は2カ月ごとに継代培養をした。

(2) 培養方法

供試菌株の培養は基本的には前報に従った¹⁷⁾。

種培養は平板培地を用いて28℃ で4~5日間、コロニーが直径約5.0cm程度になるまでインキュベートした。平板培地としては、エビオス錠剤粉末、0.5g; 酒粕、3.0g; デキストロース、2.0g を蒸留水100mlに溶解し、これをpH 6.0に調整したのち、2.0gの寒天粉末を加えオートクレーブで1.25 kg/cm² で20分間殺菌したものを用いた。なお、使用した酒粕、エビオス錠剤は市販品である。酵素生産のための培養は、上記平板培養のシャーレ2枚分に生育した菌糸を剥ぎ取り、これに16mlの殺菌水を加えワーリングブレンダーで3分間処理してホモジネートを調製し、この菌糸片ホモジネートの1.5mlを本培養液体培地100mlに移植したのち、28℃ で6日間、150 rpm の回転振とう機を用いて行った。酵素生産用の液体培地としてはポリペプトン、3.0g; 酵母エキス、0.2g; 可溶性でん粉、2.0g; NH₄NO₃、0.18g; MgSO₄·7H₂O、0.03g; ツィーン80、0.1g を蒸留水100mlに溶解し、pH 6.0に調整したもの100mlを500ml容三角フラスコに入れ同条件下で殺菌して用いた。

(3) 粗酵素液の調製

上記培養液をプフナーオートでろ過して菌糸体を分別し、得られたろ液に70%飽和となるよう硫酸アンモニウムを加えたのち、遠心分離により沈でん物を集め、これに0.5mM CaCl₂ 溶液を含む10mM 酢酸緩衝液

(pH 5.0) を少量加え溶解し、これを同緩衝液を用いて4℃ で約一昼夜透析したものを粗酵素液とした。

(4) アミラーゼの精製

CM-セルロース (Whatman) イオン交換クロマトグラフィとバイオゲル P-150 (Bio-RAD) およびトヨパール HW-55F (東ソー) のゲルろ過を行い精製した。これらの操作はすべて4℃ で行った。イオン交換クロマトグラフィは、上記酢酸緩衝液で平衡化した CM-セルロースカラム (2.6φ×80 cm) を用いて行った。これに粗酵素液を吸着させ、0~0.5 M の NaCl の濃度勾配の500mlの緩衝液を用いて溶出した。流速は2ml/min で、溶出液は10ml ずつ分取した。

得られたアミラーゼ活性画分を、酢酸緩衝液で平衡化したバイオゲルカラム (1.5φ×70 cm) を用いてゲルろ過にて分画した。試料は流速20ml/hr で溶出し、各フラクションは5ml ずつ分取した。この活性画分を集めて濃縮したのちトヨパール HW-55F カラム (1.5φ×70 cm) を用いて、上記バイオゲルを用いたと同様な条件でゲルろ過を行った。得られたアミラーゼ活性画分を最終的な精製酵素標品として以下の実験に用いた。

(5) ディスク電気泳動法

ディスク電気泳動は永井²²⁾の方法に従い、pH 8.2用のポリアクリルアミドゲルを用いて4mA/カラムの定電流で室温にて行った。電極槽用緩衝液は50mM トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.3) を使用した。泳動後のゲルは7%酢酸に溶解した1%アミドシュヴァルツ溶液を用い染色し、7%酢酸溶液で脱色した。また、非染色ゲルを0.2cmの厚さに順次切断し、1.0mlの上記緩衝液に4℃ で約12時間浸漬し、酵素の抽出を行いその抽出液について酵素活性を測定し、活性箇所を明らかにした。

(6) 分子量の測定法

未変性の精製酵素標品の分子量は前述のバイオゲル P-150 カラムを用いてゲルろ過により求めた。分子量マーカーは Mann Research Laboratories, Inc. (New York) の cytochrome *c* (12,400), myoglobin (17,800), chymotrypsinogen (25,000), ovalbumin (45,000), albumin (67,000), を用いた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-変性試料の分子量は、Weber ら²³⁾ の SDS-ゲル電気泳動法に従って0.1% SDS を含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) を用い8mA/カラムの定電流を与え泳動させ、上述のディスク電気泳動と同様に移動度を求め、その結果より算定した。なお、泳動後のゲルは0.25% Coomassie brilliant blue 溶液を用い染

Ganoderma lucidum No. 15 の産生するアミラーゼの精製とその性質

色した。

(7) 等電点の測定法

等電点は Catsimpooles²⁴⁾ の方法に従いゲル等電点電気泳動法により測定した。泳動は Ampholine (pH 3~10, LKB) を含むポリアクリルアミドゲルを用い、電極液には+極に 0.2 M 酢酸、-極に 0.2 M エチレンジアミン溶液を用いて、4℃ にて 0.14 mA/カラムの電流で行った。泳動後のゲルは、これを 0.2 cm に順次切断し、1.0 ml の蒸留水中で約 12 時間酵素の抽出を行い、その溶出液のアミラーゼ活性箇所を検出するとともに pH を測定した。

(8) ペーパークロマトグラフィー

酵素反応生成物はペーパークロマトグラフィーを行い同定した。ペーパークロマトグラフィーは東洋ろ紙 No. 50 (2×40 cm) を用い、*n*-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3, v/v/v) の展開溶媒中で上昇法によって行った。糖の発色にはアニリン水素フタル酸塩を使用した。

(9) 酵素活性測定法

アミラーゼ活性は、1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に 2% の濃度になるように溶解した可溶性でん粉溶液 (片山化学工業) を基質とし、これを 3.0 ml、酵素溶液 1.0 ml の混合液を 30℃ で 20 分間反応させ、生じた還元糖を 3,5-ジニトロフタル酸法を用いて 450 nm における吸光度を測定して定量し求めた。酵素活性の 1 単位 (U) はこの条件下で 1 分間に 1 μmol のグルコース相当の還元糖を遊離する酵素量として表示した。

(10) タンパク質の定量

タンパク質は、牛血清アルブミンを標準として Lowry 法²⁵⁾ の方法に従って定量した。

3. 結果および考察

(1) *G. lucidum* No. 15 アミラーゼの精製

G. lucidum No. 15 が培養液中に生成したアミラーゼは、培養ろ液に 70% 飽和になるように硫酸アンモニウ

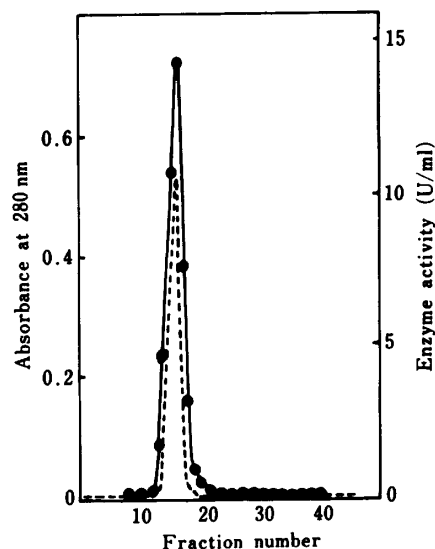


Fig. 1. Gel filtration of amylase produced by *Ganoderma lucidum* No. 15

The column was eluted with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 0.5 mM calcium chloride. -----, absorbance at 280 nm; ●, enzyme activity.

ムを添加してその活性画分を濃縮し、これを粗酵素液とした。これより、CM-セルロースを用いたイオン交換クロマトグラフィー、バイオゲルP-150ならびにトヨパール HW-55F を用いたゲルろ過を行い (Fig. 1)、粗酵素に対して収率 16% で、265 倍にまで精製した比活性 40 (U/mg タンパク質) の標品を得ることができた。

精製の各段階は Table 1 に要約した。精製標品はポリアクリルアミドならびに SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に単一のタンパク質バンドを与えた (Fig. 2)。

(2) アミラーゼの諸性質

1) pH の影響

本菌のアミラーゼの最適 pH は 4.5 であった。これは、*Rhizopus niveus* のグルコアミラーゼと一致する結果であった。微生物起源のものでは α-アミラーゼの最

Table 1. Summary of purification of amylase produced by *Ganoderma lucidum* No. 15

Purification procedure	Total volume (ml)	Protein (mg)	Total enzyme activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture filtrate	122	5,770	874	0.151	100	1.00
70% sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	28.0	1,370	630	0.460	72	3.05
CM-cellulose	37.0	74.0	588	7.95	67	52.6
Bio-gel P-150	13.5	20.3	349	17.2	40	114
Toyopearl HW-55F	2.90	1.45	58.0	40.0	16	265

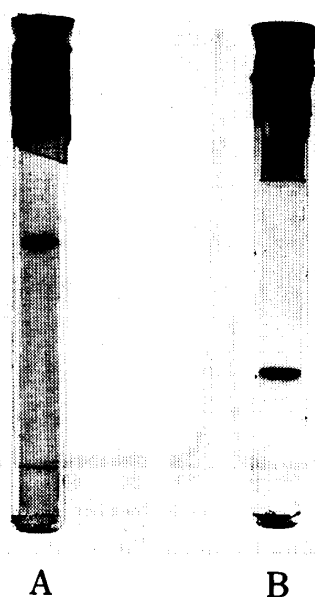


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of amylase
A: Electrophoresis of native amylase on polyacrylamide gel (7.5%). B: Electrophoresis of denatured amylase on SDS-polyacrylamide gel (10%).

適 pH は 6.0 前後のものが多い。しかし、*Bacillus* 属の中には pH 2.0, また逆に pH 10.5 に最適 pH を有するものもあり、動物や植物起源のものにはみられないようなものも報告されている²⁶⁾。β-アミラーゼでは pH 5~6 くらいに最適 pH をもつものが多く、本酵素の最適 pH は上の両アミラーゼよりも若干酸性側にあった (Fig. 3)。次に pH 安定性について試験した結果、本菌

の酵素は pH 4.5~9.0 の範囲で安定であった。この値は *R. delemere* の生成するグルコアミラーゼが pH 4.0~9.0 の範囲で安定であるのとほぼ同一の値であった²⁷⁾。

2) 温度の影響

本酵素の最適温度は 50°C であった。また pH 5.0 において 50°C で 30 分後に約 70% の活性が減少した (Fig. 4)。本酵素が 50°C を超えると急激に活性を失うことは、多くのグルコアミラーゼと類似していた²⁶⁾。

3) 等電点

本酵素の等電点は pH 6.8 であった (Fig. 5)。*R. niveus* のグルコアミラーゼのそれは pH 8.5 と報告されている²⁸⁾。

4) 分子量

バイオゲル P-150 を用いたゲルろ過の結果より算出した本酵素の分子量は 53,000 であった (Fig. 6A)。一方、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定した結果は、55,000 を示した (Fig. 6B)。これらの結果より、本酵素は 53,000~55,000 の分子量を有するモノマーであると推定した。大部分の α-アミラーゼの分子量は 50,000 前後であるが、*B. macerans* 生産のものは 145,000 とこれよりかなり大きいものも報告されている²⁸⁾。一方、グルコアミラーゼについては α-アミラーゼより若干大きく 55,000~75,000 のものが多く報告されている²⁶⁾。また、α-アミラーゼはほとんどが単一のポリペプチドからなるとされているが、*B. subtilis* の α-アミラーゼのように亜鉛を含むダイマーからなるものも存在する²⁶⁾。なお、*G. lucidum* が分泌するアミラーゼにはアイソザイ

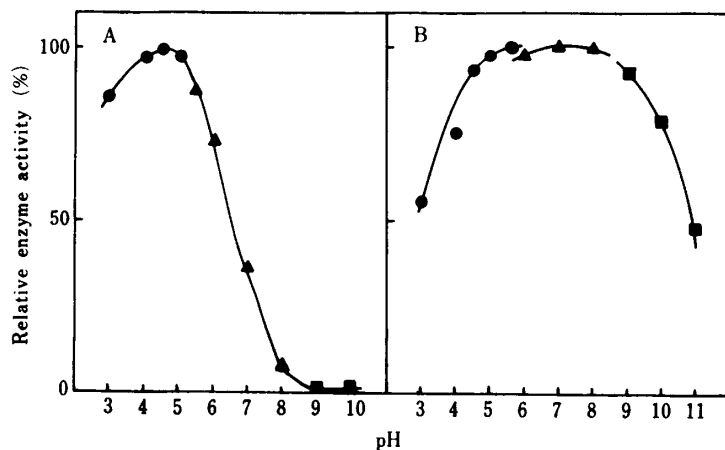


Fig. 3. Effects of pH on activity and stability of amylase

A: The enzyme activity was measured under the standard assay conditions using following buffers: ●, 10 mM sodium acetate buffer; ▲, 10 mM potassium phosphate buffer; ■, 10 mM carbonate-bicarbonate buffer. B: The enzyme was preincubated in each buffer indicated in A at 30°C for 30 min. The remaining activity was measured under the standard assay conditions.

Ganoderma lucidum No. 15 の産生するアミラーゼの精製とその性質

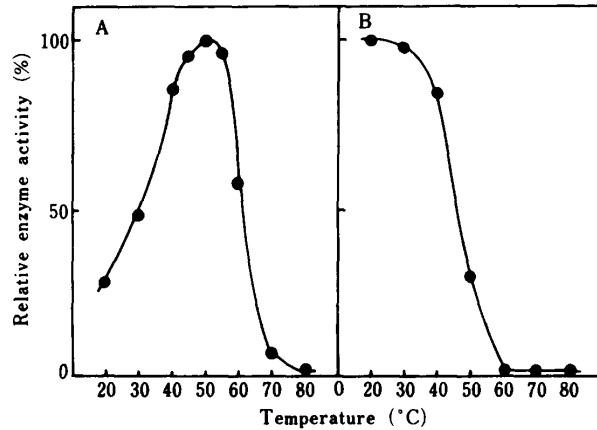


Fig. 4. Effects of temperature on activity and stability of amylase

A: The enzyme activity was measured under the standard assay conditions at various temperatures. B: The enzyme was preincubated for 1 hr at each temperature as indicated. The remaining activity was measured under the standard assay conditions.

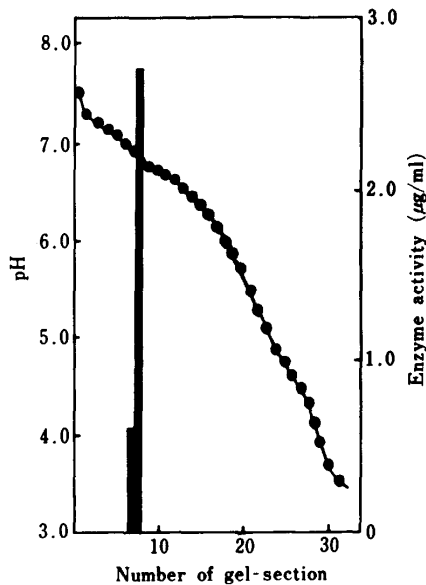


Fig. 5. Isoelectric focusing of amylase by polyacrylamide gel with Ampholine as a carrier ampholytes

Gels were cut by 0.2 cm length. Amylase activity and pH of each section were measured. —, amylase activity; ●, pH.

ムの存在を示すような実験的事実は得られなかった。

5) 金属イオンならびに各種阻害剤の酵素活性に及ぼす影響

Table 2 に各種金属イオンと阻害剤の酵素活性におよぼす影響を示した。本酵素は Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} により強い阻害を受けた。一般に α -アミラーゼは酵素活

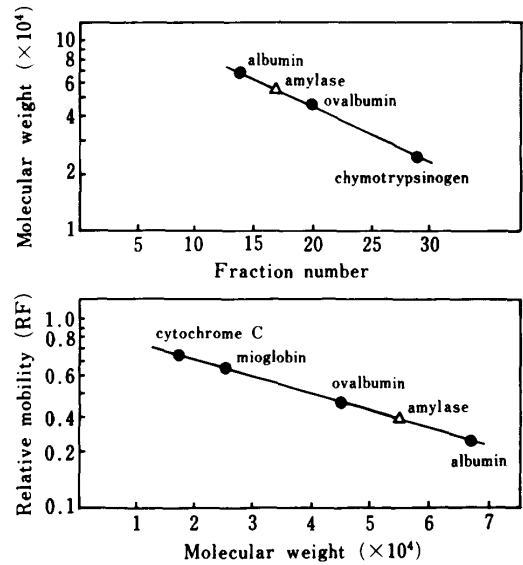


Fig. 6. Determination of the molecular weight of amylase by gel filtration on Bio-gel P-150 and by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

A: Gel filtration on Bio-gel P-150. M_r standard: cytochrome c, 12,400; mioglobin, 67,000; ovalbumin, 45,000; albumin, 67,000. B: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. M_r standard: chymotrypsinogen, 25,000; ovalbumin, 67,000.

性の最大発現およびその安定性に対して Ca^{2+} を要求するが²⁶⁾, *G. lucidum* のアミラーゼにおいてはそのような事実は認められなかった。また、本酵素はモノヨード酢酸や *p*-クロロメルクリ安息香酸などの SH 阻害剤によって阻害を受けた。

6) 基質濃度の酵素活性に及ぼす影響

可溶性でん粉に対する本酵素のミカエリス定数 (K_m) を Lineweaver-Burk の式にもとづいて求めた (Fig. 7)。本酵素の K_m 値は 0.83 % の値を示した。

7) 各種でん粉に対する作用と反応生成物

Aspergillus sp. K27 や *C. rolfsii*, *Streptococcus bovis* などは生でん粉分解力の強いアミラーゼを生産することが見いだされている^{29)~33)}。Flor らは³³⁾, *Aspergillus awamori* のグルコアミラーゼには触媒部位とは別に生でん粉の吸着部位があることを示した。本実験では *G. lucidum* のアミラーゼが生でん粉に対する分解能を示すかどうか、また糊化でん粉分解力との比較を次式に示す生でん粉分解率 (%) より調べた。

$$(\text{生でん粉分解力}) / (\text{糊化でん粉分解力}) \times 100$$

その結果本菌の酵素は小麦でん粉 (18.6%), トウモロコシでん粉 (16.5%) と比較的高い生でん粉の分解活性を認めた (Table 3)。しかし、ジャガイモでん粉に

Table 2. Effects of various reagents on activity of amylase

Compound (concentration)	Relative enzyme activity (%)
None (1 mM)	100
FeSO ₄ (1 mM)	18
FeCl ₃ (1 mM)	2
CoCl ₂ (1 mM)	92
NiCl ₂ (1 mM)	74
HgCl ₂ (1 mM)	7
CaCl ₂ (1 mM)	100
ZnCl ₂ (1 mM)	83
CuSO ₄ (1 mM)	52
AgNO ₃ (1 mM)	15
MgCl ₂ (1 mM)	89
p-Chloromercuribenzoate (1 mM)	52
N-Ethylmaleimide (1 mM)	100
Iodoacetamide (1 mM)	18
Dithiothreitol (1 mM)	111
Cystein (1 mM)	101
Sodium dodecyl sulfate (1 mM)	103
Toriton X100 (0.05%)	92
Tween 80 (0.05%)	96

The assay mixture containing 12 μ g of the enzyme was incubated in the presence of each reagent.

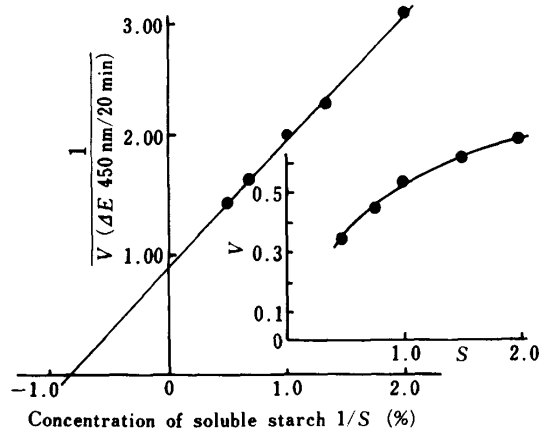


Fig. 7. Effects of concentration of soluble starch on activity of amylase

The assay mixture contained 12 μ g of the enzyme. The activity was measured under the standard assay conditions with various concentrations of soluble starch.

対しては活性はきわめて低く、小麦でん粉やトウモロコシでん粉の1%にすぎない値であった。でん粉粒の性質はその起源により異なり、したがってアミラーゼによる

Table 3. Raw starch digesting ability of amylase

Starch	Raw starch digesting ability (%) [*]
Wheat	18.6
Corn	16.5
Sweet potato	5.8
Potato	0.2

Raw and cooked starches (8 mg) were incubated with about 30 μ g of the enzyme in 0.8 ml of 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) for 30 to 60 min at 40 °C, respectively. The reaction mixtures were gently stirred. Reducing sugar produced during the incubation was determined by the method using 3,6-dinitrophenylthale. ^{*} (Amount of reducing sugar produced from raw starch)/(amount of reducing sugar produced from cooked starch) \times 100.

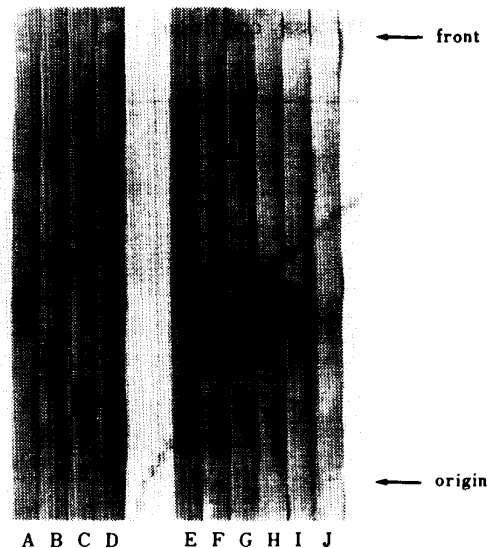


Fig. 8. Paper chromatograms of hydrolysates by amylase

Raw starches (8 mg) were incubated with 30 μ g of the enzyme in 0.8 ml of 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) for 12 hr at 40°C, and cooked starches (8 mg) were incubated with 3 μ g of the enzyme. A, glucose; B, maltose; C, maltotriose; D, maltotetraose; E, cooked wheat starch; F, raw wheat starch; G, cooked sweet potato starch; H, raw sweet potato starch; I, cooked potato starch; J, raw potato starch.

分解能もでん粉の種類によって異なる。これは、分解の進行とともにでん粉の特異な構造が生じたり、また糖質以外の構成要素（酢酸やリン酸など）を含むことが考えられている。ジャガイモでん粉などは分解されにくいものに属しているとされているが²⁶⁾、本酵素の結果はそれ

Ganoderma lucidum No. 15 の産生するアミラーゼの精製とその性質

と合致するものと考えられる。

Fig. 8 は本アミラーゼによる生でん粉と糊化でん粉に対する作用について、それらの反応生成糖をペーパークロマトグラフィーを用いて調べたものである。その結果、生ジャガイモでん粉においてはグルコースをはじめとしてオリゴ糖の生成が認められなかったが、他のでん粉においては生および糊化したもので、ともにグルコースと一致する反応生成物のみが検出された。

これらの結果より、*G. lucidum* は生でん粉分解能を有するアミラーゼを産生し、本酵素によるでん粉の分解生成物としてはグルコースのみが検出され、オリゴ糖などが検出されなかったことから、本酵素はグルコアミラーゼであることが示唆された。本酵素の pH 等に対する性質は菌類のグルコアミラーゼと類似点が見いだされている。これまでに報告されている菌類のグルコアミラーゼについて、でん粉の分解率に関しては *R. delmar*, *R. niveus*, *A. niger* の酵素が中心に種々検討されている²⁷⁾³⁴⁾。*G. lucidum* の酵素がでん粉に対してどのくらいの分解率を示すかどうかは今後検討しなければならないところである。また、グルコアミラーゼはでん粉より β -グルコースのみを生成するといわれているので、この点に関しても検討する必要があると残されている。

すでに担子菌 *C. rolfii* AHU9627 に生でん粉分解能を有するアミラーゼが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。この酵素は、いまだ精製されていないため、*G. lucidum* の酵素の性質との比較を現時点で詳細に行うことはできないが、今後興味のもたれるところである。

4. 要 約

Ganoderma lucidum No. 15 が細胞外に産生するアミラーゼをイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等によりポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 的に均一になるまでに精製し、その性質を調べた。

(1) 本酵素は、その分子量がゲルろ過法により 53,000、SDS-PAGE により 55,000 であると推定されたことから、モノマーからなることが示された。

(2) 本酵素の活性の最適 pH は 5.0、最適温度は 55°C であった。また、等電点は 6.8 を示した。酵素は 0~40°C、pH 4.5~9.0 の範囲で安定であった。

(3) 可溶性でん粉に対する K_m 値は 83% であった。

(4) 本酵素の活性は Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ , モノヨード酢酸, β -クロロメルクリ安息香酸によって阻害された。

(5) 本酵素は数種の生でん粉に対しても作用し、小麦ならびにトウモロコシの生でん粉に対する活性は、それ

ぞれを糊化したものの 18.6%, 16.5% の値を示した。しかしながら、ジャガイモ生でん粉に対してはほとんど作用しなかった。

(6) 本酵素は、これらのでん粉を基質とした反応で、グルコースのみを生成することからグルコアミラーゼの一種であると推定された。

終わりに、菌株を分与いただきました東京医科歯科大学教養学部金城典子助手、本研究をまとめるにあたり有益な助言をいただきました和洋女子大学御園光信教授、また、実験に協力くださった和洋女子大学黒田智枝前助手補に深く感謝いたします。

引用文献

- Petterson, G., Cowling, E.B. and Porath, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 9 (1963)
- 奈良 潔, 畚野 剛, 吉野 弘: *醸工誌*, **43**, 653 (1965)
- 若林和正, 神田鷹久, 西沢一俊: *醸工誌*, **44**, 669 (1966)
- Nishizawa, K.: *J. Biochem.*, **42**, 825 (1955)
- Terashita, T., Oda, K., Kono, M. and Murao, S.: *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, **26**, 397 (1985)
- Sadana, J.C., Shewale, J.G. and Deshpande, M.V.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 730 (1979)
- Kaji, A. and Yoshihara, O.: *Biochim. Biophys. Acta*, **250**, 367 (1971)
- Kaji, A., Sato, M., Shinmyo, N. and Yasuda, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1729 (1972)
- 七字三郎, 三宮淑身: *醸酵協会誌*, **20**, 51 (1962)
- Kikuchi, E., Kobayashi, H., Shibuya, H., Kusakabe, I. and Murakami, K.: *日食工誌* **35**, 157 (1988)
- Kawai, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1571 (1971)
- 小林文男, 矢吹 稔, 星野一雄, 坂本政義: *農化*, **49**, 81 (1975)
- 川合正允: *農化*, **47**, 473 (1973)
- Sasaki, H., Kurosawa, K. and Takao, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1661 (1986)
- Takao, S., Sasaki, H., Kurosawa, K., Tanida, M. and Kamagata, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1979 (1986)
- Ohno, N., Sawada, M. and Misono, T.: *和洋女大紀要*, 第 27 集 (家政系編), 1 (1989)
- 大野信子, 黒田智枝, 御園光信: *和洋女大紀要*, 第 30 集 (家政系編), 1 (1990)
- Sone, Y., Wada, N. and Misaki, A.: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2641 (1985)
- 水野 卓, 加藤尚美, 戸塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水政子: *農化*, **58**, 871 (1984)
- Nakamura, H., Ishihara, S., Uchida, M., Komoda,

- Y., Kanda, H. and Yamazaki, K.: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1367 (1985)
- 21) Kikuchi, T., Matsuda, A., Uchida, S., Murai, Y. and Ogita, Z.: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2624 (1985)
- 22) 永井 裕: 蛋白質 核酸 酵素 (別冊, 物理化学実験法 3), 3 (1967)
- 23) Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, **224**, 4406 (1969)
- 24) Catsimpoolos, N.: *Anal. Biochem.*, **26**, 480 (1968)
- 25) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.3.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 26) 谷口 肇: アミラーゼ (中村道徳), 学会出版センター, 東京, 141 (1986)
- 27) 大西正健, 岡田巖太郎, 谷口 肇, 坂野好幸: 蛋白質 核酸 酵素, **30**, 489 (1985)
- 28) 小林昭一, 貝沼圭二: 発酵と工業, **36**, 176 (1978)
- 29) 阿部淳一, フレデリコ W. ベルグマン, 小幡和哲, 檜作 進: 澱粉科学, **32**, 128 (1985)
- 30) Takano, S., Sasaki, H., Kurosawa, K., Tanida, M. and Kamagata, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1979 (1986)
- 31) 溝上恭平, 小崎道雄, 北原覚雄: 農化, **51**, 299 (1977)
- 32) 溝上恭平, 小崎道雄, 北原覚雄: 澱粉科学, **25**, 132 (1978)
- 33) Flor, P.Q. and Hayashida, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 905 (1983)
- 34) Abe, J., Nagano, H. and Hizukuri, S.: *J. Appl. Biochem.*, **7**, 235 (1985)