

琉球大学学術リポジトリ

泡盛麹菌の生産する α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼの酵素化学的性質(生物資源科学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安田, 正昭, 山田, 剛史, 石原, 昌信, 当山, 清善, Yasuda, Masaaki, Yamada, Takeshi, Ishihara, Masanobu, Toyama, Seizen メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3817

泡盛麹菌の生産する α -アミラーゼおよび グルコアミラーゼの酵素化学的性質

安田正昭*・山田剛史*・石原昌信*・当山清善*

Masaaki YASUDA, Takeshi YAMADA, Masanobu ISHIHARA and
Seizen TOYAMA: Properties of α -amylase and glucoamylase
from *Aspergillus awamori*

Summary

Awamori koji prepared by growing *Aspergillus awamori* on steamed rice is a very important material for the production of awamori beverage which is a traditional distilled liquor in Okinawa Prefecture, Japan. In awamori beverage production, the strain which has high amylolytic enzyme activities and acid productivity is needed. And thus, screening of *Aspergillus awamori* for the object was carried out as reported in the previous paper.

In this paper, properties of α -amylase and glucoamylase from selected strain (*Aspergillus awamori*) were investigated. α -Amylase had the maximum reactivity at pH 4.5–5.5 and 65°C. The enzyme was quite stable in a range of pH 3.0–6.0, and stable up to 65°C. Glucoamylase had the maximum reactivity at pH 4.3–5.5 and 60°C. The enzyme was stable in a range of pH 3.5–6.0 and stable up to 60°C. Glucoamylase was active on the gelatinized starch prepared from glutinous rice, nonglutinous rice, broken rice imported from Thailand (raw material for awamori beverage, *indica* type), potato, sweet potato, wheat and corn as well as soluble starch. The hydrolysis degree of starch prepared from broken rice of Thailand was rapidly increased with increasing time up to 2 hr. The limit of hydrolysis of the starch by this enzyme was 82%. It was found that the enzyme could digest raw rice starch maximally at pH 3.2–3.5. The enzyme was very active on raw rice starch such as glutinous, nonglutinous and broken rices but was only a little active on raw potato starch.

* 琉球大学農学部生物資源科学科

緒 言

泡盛は黒麹菌（泡盛麹菌）を使用した米麴と水を原料として発酵させた一次もろみを単式蒸留器で蒸留した蒸留酒で、沖縄県の代表的な特産品である。最近、泡盛製造における原料米利用技術の高度化、消費者ニーズに合致した酒質の多様化及び高級化技術の確立が要請され、それに対応する技術開発として、糖化後発酵による泡盛製造⁸⁾や製麴時間差麴による泡盛製造¹⁰⁾等についても検討されつつある。これらの技術開発を行うにあたり、使用目的に合致した微生物を選択することはきわめて重要である。そこで、著者ら¹⁵⁾は、酵素活性や生酸性を指標とした優良泡盛麹菌の検索・選抜を行った。

泡盛麹菌の酵素に関する研究は、1967年に当山ら⁹⁾が泡盛醸造の立場から α -アミラーゼ、糖化アミラーゼ及びプロテアーゼの基礎的性質について、1981年に布川ら⁵⁾が、その他に酸性カルボキシペプチダーゼ、トランスグルコシダーゼ及び生デンプン分解力の分布について報告した。また、岩野ら¹⁾は焼酎白麴と泡盛黒麴の各種酵素の性質について調べている。

本研究においては、アルコールの収量増大や泡盛の多様化傾向に合致した泡盛製造技術の確立を図るための基礎的知見を得るために、著者らが選抜した優良泡盛麹菌の生産する α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの酵素化学的諸性質を調べたので報告する。

実験方法

1. 供試泡盛麹菌

供試泡盛麹菌はさきに選抜した5菌株¹⁵⁾の中から酵素活性及び生酸性のバランスがよくとれた3142菌 (*Aspergillus awamori* Nakazawa, IFO 4033) を使用した。

2. 泡盛麹菌の製麴

(1) 種麴の調製

泡盛麹菌の培養は次の通り行い、種麴を調製した。すなわち、タイ国産碎米10gを洗米し、1時間水にて浸漬したのち、水切り後100ml容三角フラスコにとり、オートクレーブで120℃、10分間加圧蒸煮した。冷却後の蒸煮米に供試菌を接種し、30℃にて70~80時間培養を行い、種麴を調製した。

(2) 麴蓋による製麴

タイ国産碎米1.5kgを洗米し、1時間浸漬した。水切り後オートクレーブにて120℃、20分間加圧蒸煮した。冷却後の蒸米に上記方法で調製した種麴を接種し、30℃で所定の時間培養を行い、出麴とした。

(3) デンプンの調製

タイ国産碎米、うるち米及びもち米からのデンプンの調製は日本生化学会編、生化学実験講座⁴⁾の方法に準じて行った。すなわち、各原料米を粉碎し、5倍量の0.2%NaOH溶液に懸濁した。このものを5℃の低温室でよく攪拌しながら、米粉中のタンパク質及び脂肪を3時間抽出した。抽出終了後はデカンテーションにより抽出液を除いた。再びこのものを同上NaOH溶液で攪拌し、不純物質の抽出を行った。この操作を4回繰り返して行った。アルカリ処理後の試料は、純水でよく洗浄したのち、アルコール脱水し、45℃以下で減圧乾燥した。最後に250メッシュのふるいで篩別したものをサンプルとして実験に供した。

米デンプン以外の馬鈴薯、甘藷、小麦及びトウモロコシデンプンは和光純薬工業株式会社の製品（化学用）を使用した。また、可溶性デンプンは和光純薬工業株式会社の製品（生化学用）を使用した。

(4) 分 析

酵素液の調製は次の通り行った。酵素の抽出は麴10gに0.5%NaCl溶液を含む0.2M酢酸緩衝液（pH 5.0）を50ml加え、15~20℃で3時間振とうして行った。抽出液を遠心分離機により遠心分離し、上澄み液を0.01M酢酸緩衝液（pH5.0）で一夜透析を行い、透析内液を20mlに定容したものを粗酵素液とし

て実験に供した。

α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ活性の測定は可溶性デンプンを基質に用い、国税庁所定分析法³⁾かあるいは既報^{14,15)}の方法に準じて行った。なお、グルコアミラーゼの測定は、酵素反応で生成したグルコース量をグルコースオキシダーゼ（ダイヤカラー・GC、(株)東洋紡社製）を用いる酵素法で定量することにより求めた。

生デンプン分解活性を調べるための反応液の配合割合は0.1M酢酸緩衝液（pH 3.4）1ml、2%デンプン懸濁液1ml及び酵素液0.2mlとし、30℃で5時間振とうして酵素反応を行い、氷冷して酵素反応を停止した。遠心分離により沈澱物を除去し、上澄み液を得た。酵素反応により生デンプンから生成されたグルコース量をグルコースオキシダーゼにより定量した。

実験結果及び考察

1. α -アミラーゼの酵素化学的性質

(1) α -アミラーゼ活性に及ぼすpHの影響とpH安定性

α -アミラーゼ活性とpHとの関係を調べるために、各pHで酵素反応を行い酵素活性を調べた。結果をFig. 1 (A) に示した。最も高い酵素活性を100としたときの相対値で示した。本酵素の反応最適pHは4.5~5.5の範囲で得られた。本酵素はpH3.0では63%の相対活性を有したものの、pH7以上のアルカリ側ではほとんど作用を示さなかった。当山ら⁹⁾が泡盛麹から分離した *Aspergillus awamori*

(Strain 29-2) の α -アミラーゼの反応最適pHは4.5~6.0と報告されており、本酵素の反応最適pHはそれに比べてやや酸性側にあることが明らかとなった。一方、岩野ら¹⁾が報告した泡盛黒麹菌 (*Aspergillus awamori*、河内源一郎商店) の α -アミラーゼはpH5.0付近に反応最適pHがあり、供試菌株のそれと類似していることがわかった。

本酵素のpH安定性を調べるために、酵素液を各pHで37℃、30分間処理したのち最適pHに戻して酵素反応を行い、その残存活性を調べた (Fig. 1(B))。未処理の酵素活性を100とした時の残存活性で示

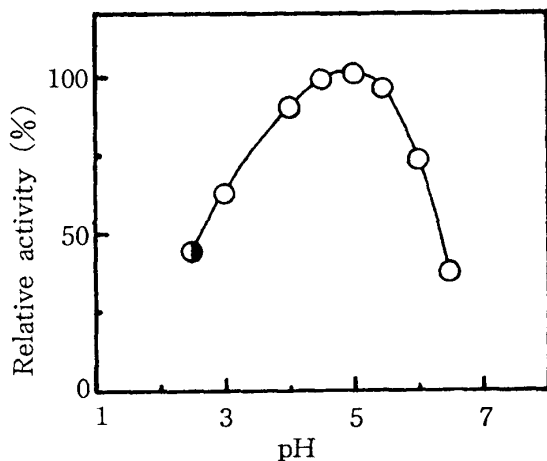


Fig. 1 (A).

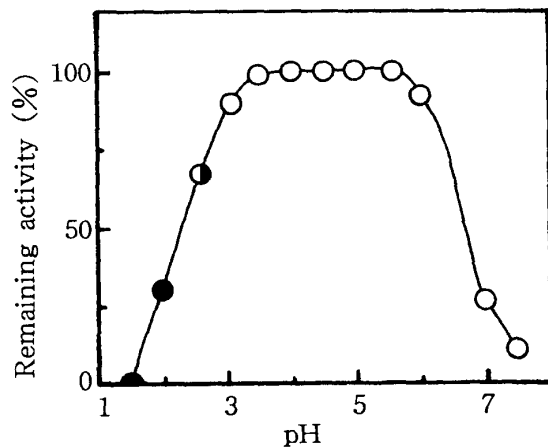


Fig. 1 (B).

Fig. 1. Effect of pH on the activity of α -amylase (A) and enzyme stability (B).

The enzyme activity was assayed at various pHs (A). The enzyme was incubated at pHs and 37℃ for 30 min, and the activity was then assayed at pH 5.0 (B). Buffers:—●—; HCl-Sodium acetate buffer, —○—; Acetate-Sodium acetate buffer

した。本酵素はpH3.0~6.0のpH範囲で安定で、pHが3.0以下あるいは6.0以上では急激な失活を受けた。供試菌株の α -アミラーゼのpH安定性は報告されている泡盛黒麹菌 (pH3.0~6.0) の場合と全く同様の傾向を示した¹⁾。なお、泡盛麹菌の α -アミラーゼのpH安定性は清酒麹菌 (*Aspergillus oryzae*, 黒判もやし; 5.0~8.0のpH範囲で安定) のそれに比べて酸性側できわめて安定であった¹⁾。

(2) α -アミラーゼ活性に及ぼす温度の影響と温度安定性

α -アミラーゼ活性と反応温度との関係を調べるために、各温度で酵素反応を行い酵素活性を調べ、その結果をFig.2(A)に示した。本酵素活性は反応温度に依存して増大し、65℃の時に最大の値を示した。報告されている泡盛黒麹菌の α -アミラーゼの反応最適温度は60℃¹⁾であることから供試菌株の α -アミラーゼの反応最適温度はそれに比較して5℃高いことが明らかとなった。

本酵素の熱安定性を調べるためにpH5.0で、各温度で10分間保持したのちの残存活性を調べ、その結果をFig.2(B)に示した。無処理の酵素活性を100としたときの残存活性で示した。本酵素は60℃まで90%以上の残存活性を有していた。しかし、それ以上の温度では本酵素は急激な熱失活を受けた。供試菌株の α -アミラーゼの熱安定性は報告されている泡盛黒麹菌のそれに比べて10℃も高いことが明らかとなった。

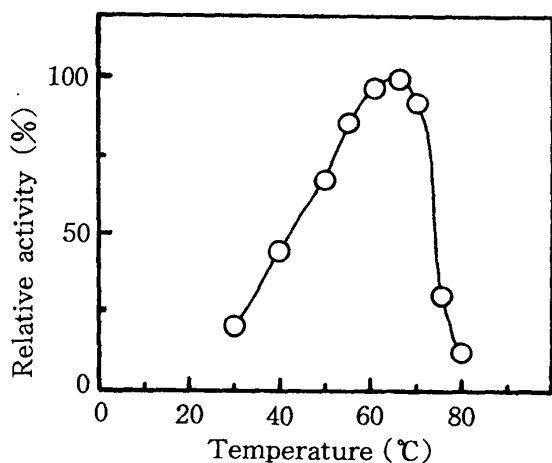


Fig. 2 (A).

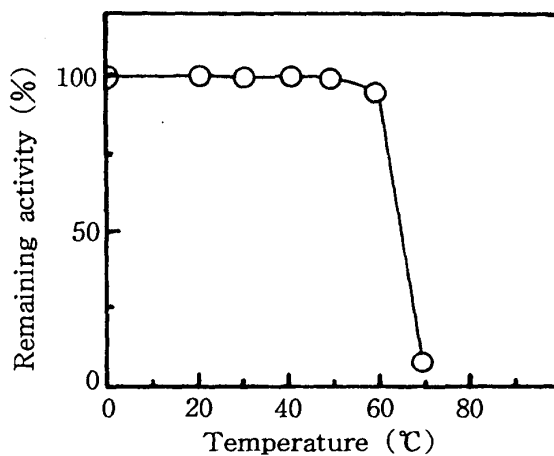


Fig. 2 (B).

Fig. 2. Effect of temperature on the activity of α -amylase (A) and the enzyme stability (B).

The enzyme activity was assayed at various temperatures (A). The enzyme was incubated at various temperatures and at pH 5.0 for 10 min, and the activity was then assayed (B).

2. グルコアミラーゼの酵素化学的性質

(1) グルコアミラーゼ活性に及ぼすpHの影響とpH安定性

本酵素反応の最適pHを調べるために、各pHで酵素反応を行い酵素活性を調べ、その結果をFig.3(A)に示した。本酵素の反応最適pHは4.3~5.3付近にあることが明らかとなった。本酵素はpH3.0では72%、pH7.0で47%の相対活性を示し、アルカリ側ではほとんど作用しなかった。泡盛麹菌グルコアミラーゼの反応最適pHは、*Aspergillus awamori* strain 29-2の糖化型アミラーゼでは3.5~7.0⁹⁾、泡盛黒麹菌で、3.2~5.5¹⁾と報告され、本供試菌株グルコアミラーゼのそれは後者の菌株と類似の傾向を示した。

本酵素のpH安定性を調べるために、酵素液を各pHで37℃、30分間処理したのち最適pHに戻して酵素反応を行い、その残存活性を調べた (Fig. 3(B))。未処理の酵素活性を100とした時の相対値で示し

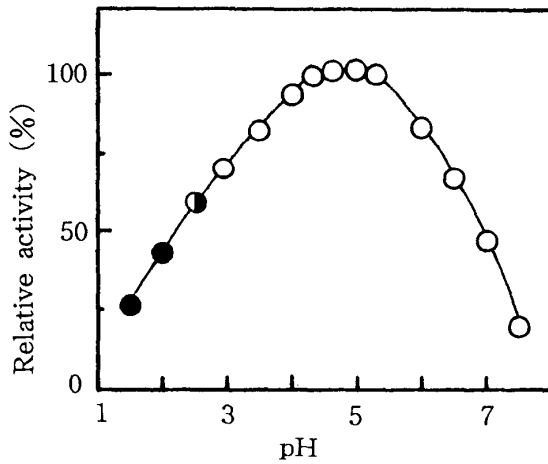


Fig. 3 (A).

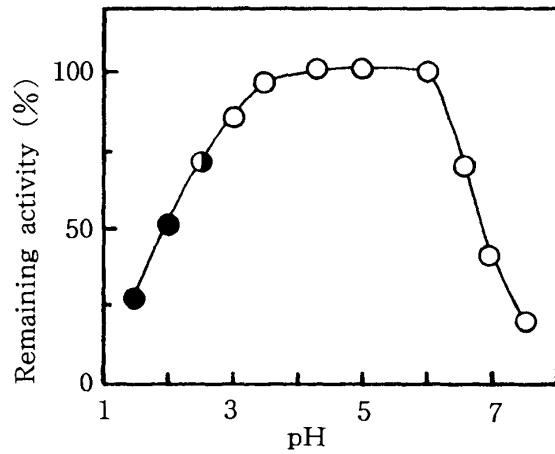


Fig. 3 (B).

Fig. 3. Effect of pH on the activity of glucoamylase (A) and the enzyme stability (B).

The enzyme activity was assayed at various pHs (A). The enzyme was incubated at pHs and 37°C for 30 min, and the activity was then assayed at pH 5.0 (B). Buffers: —●—; HCl-Sodium acetate buffer, —○—; Acetate-Sodium acetate buffer

た。本酵素はpH3.5~6.0の範囲で90%以上の残存活性を示した。本酵素はpHが3.0以下あるいは6.5以上では急激な失活を受けた。

(2) グルコアミラーゼ活性に及ぼす温度の影響と温度安定性

本酵素の反応最適温度を調べるために、各温度で酵素反応を行い酵素活性を調べ、その結果をFig. 4 (A)に示した。本酵素活性は反応温度に依存して増大し、温度が60°Cの時に最大の値を示した。供試

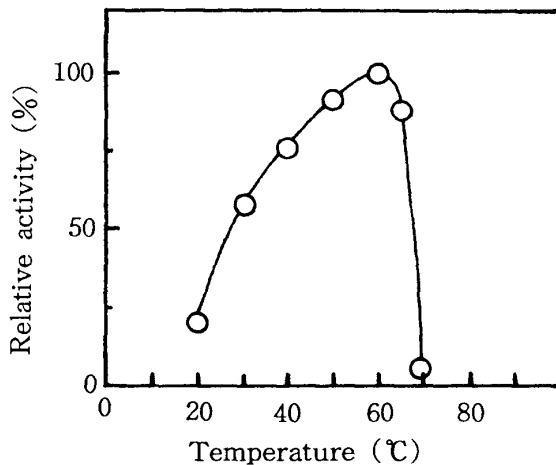


Fig. 4 (A).

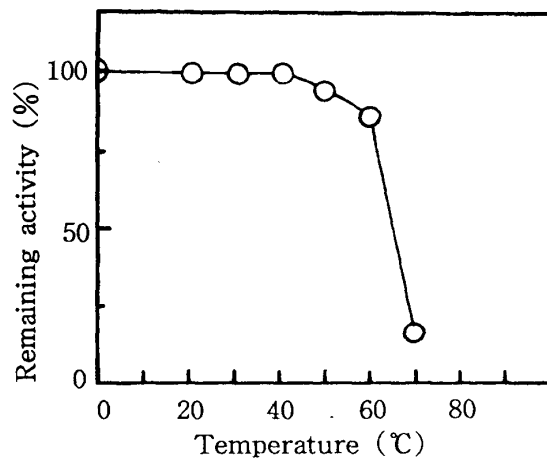


Fig. 4 (B).

Fig. 4. Effect of temperature on the activity of glucoamylase (A) and the enzyme stability (B).

The enzyme activity assayed at various temperatures (A). The enzyme was incubated at various temperatures and at pH 5.0 for 10 min, and the activity was then assayed (B).

菌株のグルコアミラーゼの反応最適温度は報告されている泡盛黒麹菌のそれ (60°C ¹⁾) と類似していた。本酵素の熱安定性を調べるためにpH5.0で各温度で10分間処理したのちの残存活性を調べた(Fig.4(B))。本酵素は 60°C で90%近くの残存活性を有していた。それ以上の温度では本酵素は急激な熱失活を受けた。供試菌株のグルコアミラーゼの熱安定性は報告されている泡盛麹菌のそれ (50°C ¹⁾) に比べて 10°C も高いことがわかった。

以上考察したきたように供試菌株の生産する α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼはこれまでに報告されているものに比較して反応最適pH及びpH安定性には同様の傾向が見られるものの、反応最適温度が高く、熱安定性に優れていることが明らかとなった。

一般に、泡盛製造における発酵もろみのpHは3.5前後とされている。伝統的な泡盛製造法では、発酵もろみの温度は季節により異なるが、現在では、 28°C 以下になるように温度管理が行われている。上記のように、供試泡盛麹菌の生産する酵素 (α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼ) は酸性側で安定であることや温度安定性等で特に優れた酵素学的特性を有しているのもろみ中の厳しいpH及び温度環境の中にあっても、比較的安定な状態でもろみ中の米デンプンに作用し、グルコースを生成することが出来るものと推察された。今後、本菌株の米麹を用いた泡盛の試験醸造を行い、従来法によるものと比較検討を行う必要があり、今後の課題である。

(3) グルコアミラーゼの各種糊化デンプンに対する作用

本酵素の糊化デンプン〔米 (タイ国産碎米、うるち米、もち米より調製、馬鈴薯、甘藷、小麦、とうもろこしの各種糊化デンプン) に対する反応性を調べ、その結果をFig. 5に示した。結果の表示は可溶性デンプンに対する反応性を100としたときの相対値で示した。本酵素はタイ国産碎米デンプンを始め供試デンプンのいずれにもよく作用した。供試菌株の生産するグルコアミラーゼの各種の糊化デンプン〔米 (タイ国産碎米、うるち、もち)、馬鈴薯、甘藷、小麦、とうもろこしのデンプン) に対する反応性を調べたところ、いずれも可溶性デンプンとほぼ同様の値を示した。本酵素の糊化デンプンに対する基質特異性は低く、その種類にはほとんど限定されないことが判明した。

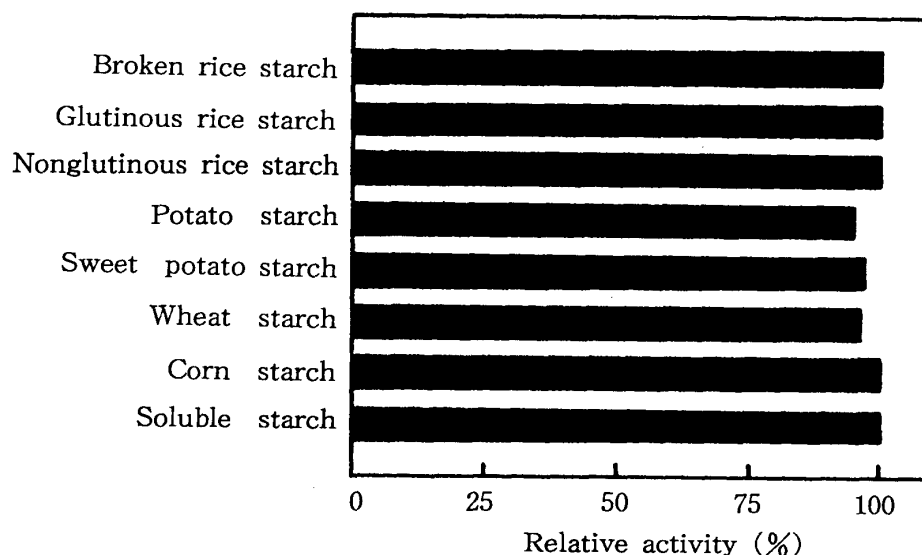


Fig. 5. Relative rates of the initial reaction velocity of glucoamylase on various starches.

The rates of initial reaction velocity were expressed relative to that of the soluble starch, regarded as 100.

次に、本酵素のタイ国産碎米デンプンに対する加水分解率を調べ、その結果をFig. 6に示した。本酵素によるタイ国産碎米デンプンの加水分解率は反応時間の経過に伴い増大した。反応2時間目までに60

%以上の値を示し、それ以降は24時間まで緩やかに増大した。反応24時間では82%の加水分解率を示した。Medderら²⁾は黒麹菌 (*Black Aspergillus*) のグルコアミラーゼの可溶性デンプンに対する加水分解率は75%であったと報告しており、供試泡盛麹菌のそれは報告値に比べて7%高い値を示した。Uedaら¹¹⁾は黒麹カビのグルコアミラーゼを馬鈴薯あるいはとうもろこしの可溶性デンプンに作用させたところいずれも60~70%の分解率であった。しかし、それにイソアミラーゼを添加することによりその加水分解率を95%以上に増大させることに成功した。照屋⁹⁾はタイ国産碎米で調製した泡盛麹の糖化試験を行ったところ、糖化が完全に行われず、未分解の麴米の存在を観察している。著者らにより選抜された泡盛麹菌グルコアミラーゼのタイ国産碎米デンプンに対する加水分解率はこれまでに報告されている可溶性デンプンに対するそれに比べて高い値を示したことから、本酵素とともにイソアミラーゼあるいはプルラーゼなどの枝切り酵素を併用すれば、泡盛麹の糖化率がさらに高められるものと期待される。

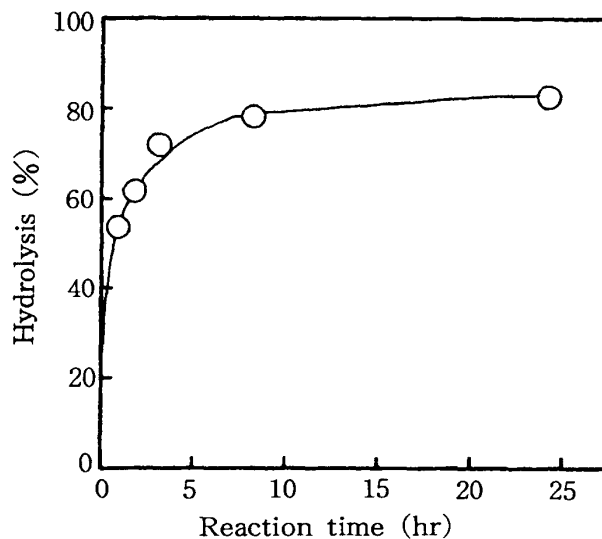


Fig. 6. Hydrolysis of rice-starch by glucoamylase.

The reaction mixture, containing 10 ml of 2% starch (prepared from broken rice of Thailand) solution, 2 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 5.0), and 1.0 ml of enzyme solution was incubated at 40°C. An aliquot of the reaction mixture was withdrawn at intervals as indicated in the figure, and glucose liberated was measured by using a glucose oxidase kit.

3. 供試菌株の生デンプン分解作用

生デンプン分解活性に及ぼすpHの影響について調べ、その結果をFig. 7に示した。本酵素反応の最適pHは3.2~3.5にあることが明らかとなった。pH2.2あるいは5.0においても50%以上の相対活性を有していた。供試菌株の α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼの糊化デンプンに対する反応最適pHは5.0付近にあったことからデンプンを糊化するかしないかはデンプン分解反応の最適pHに大きく影響を与えることが指摘される。岩野ら¹⁾によれば、麹菌の生デンプン分解作用の反応最適pHは焼酎白麹菌 (*Aspergillus kawachii*、河内源一郎商店) で3.5、泡盛黒麹菌で5.0、清酒麹菌で4.5であった。なお、清酒麹菌の生デンプン分解活性はきわめて低く、通常の10倍量の酵素を使用して調べたとされている。供試菌株の生デンプン分解反応の最適pHは岩野らの泡盛黒麹菌 (pH5.0) のそれよりも酸性側にあることが明らかとなった。一般に、泡盛製造における発酵もろみのpHは3.5前後とされており、供試菌株の生デンプン分解活性はこのpH領域できわめて高い値を示したことから、泡盛もろみ中で、泡盛

麴の製麴過程で β 化が起こった米デンプン対しても本酵素がよく作用し順調な糖化に寄与すると期待される。

供試菌株の各種生デンプン分解活性を調べるために、米（タイ国産碎米、うるち米、もち米より調製）、馬鈴薯、甘藷、小麦、とうもろこしデンプンに対する反応性を調べ、その結果をFig. 8に示した。結果の表示はうるち米デンプンに対する反応性を100としたときの相対値で示した。供試菌株の生デンプン分解活性はうるち米、タイ国産碎米、もち米などで高い値を示し、小麦、とうもろこし、甘藷で比較的高い値を示した。しかし、供試菌株の生馬鈴薯デンプン分解活性はきわめて低い値を示した（相対活性、9%）。

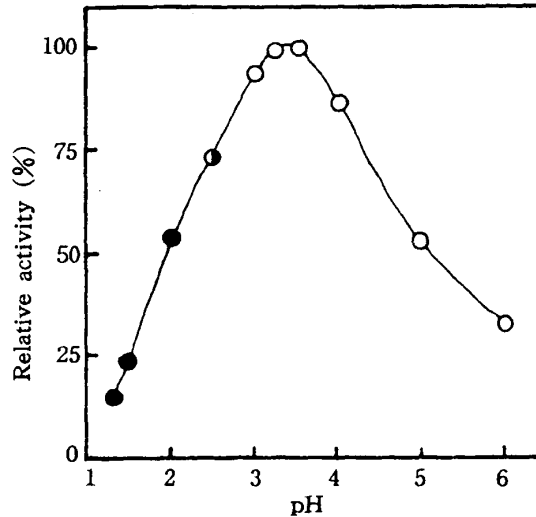


Fig. 7. Effect of pH on raw starch digestion.

The reaction mixture containing 1 ml of 2% raw rice starch (prepared from broken rice of Thailand) suspension, 1 ml of desired pH and 0.2 ml of the enzyme solution, was incubated at 30°C for 5 hr. Glucose liberated in the reaction mixture was determined by using a glucose oxidase kit.

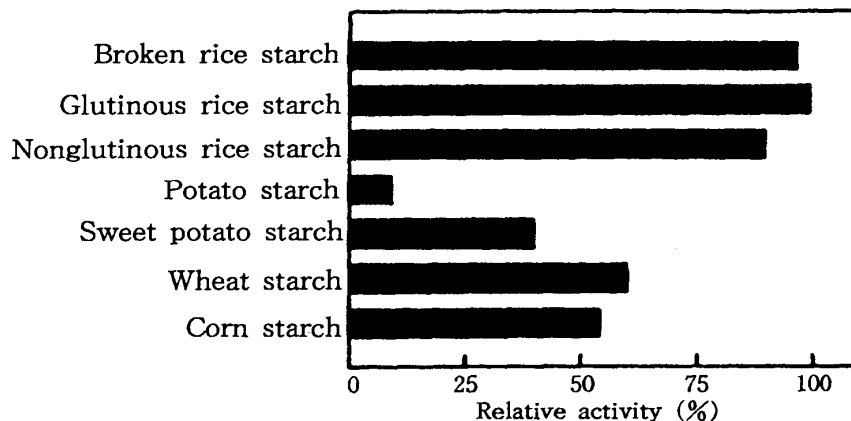


Fig. 8. Effect of various kinds of starches on raw starch digestion.

The reaction mixture containing 1 ml of various 2% raw starch suspensions, 1.0 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 3.4) and 0.2 ml of enzyme solution, was incubated at 30°C for 5 hr. Glucose liberated in the reaction mixture was determined by using a glucose oxidase kit.

以上、供試菌株の生デンプン分解作用について述べたが、今後、 α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼの単離・精製を行い、両酵素の生デンプンに対する特性について検討する必要がある。黒麹菌の生産するグルコアミラーゼは生デンプン分解能を有していることが知られており、黒麹菌酵素の生デンプン分解反応を利用して、生米デンプン¹²⁾や生キャッサバデンプン¹³⁾から無蒸煮によるエタノール生産に関する研究成果がすでに報告されている。最近、無蒸煮の白米⁶⁾またはその他の穀類（大麦、ライ麦、コーングリッツ及びソバ）⁷⁾を用いる本格焼酎の製造も検討されている。

今後、供試菌株の酵素化学的特性を利用することにより、原料米の高度利用化あるいは酒質の多様化等、泡盛製造の技術開発への貢献が期待される。

本研究は沖縄県産業振興基金により行われたものであり、厚く御礼を申し上げます。

要 約

酵素活性及び生酸性のバランスがとれた泡盛麹菌 (*Aspergillus awamori*, Nakazawa IFO 4033) の生産する α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼの酵素化学的諸性質を検討し、以下の結果を得た。

- (1) 供試菌株の生産する α -アミラーゼの反応最適pHは4.5~5.5、pH安定性は3.0~6.0の範囲で安定であった。本酵素の反応最適温度は65℃、温度安定性は60℃まで安定であった。
- (2) 供試菌株の生産するグルコアミラーゼの最適pHは5付近(4.3~5.3)で、pH安定性は3.5~6.0の範囲で安定であった。本酵素の反応最適温度は60℃、温度安定性は60℃まで安定であった。
- (3) 供試菌株グルコアミラーゼの米(タイ国産碎米、うるち、もち)、馬鈴薯、甘藷、小麦、とうもろこしの糊化デンプンに対する反応性を調べたところ、いずれも可溶性デンプンとほぼ同様の値を示した。
- (4) 供試菌株グルコアミラーゼのタイ国産碎米デンプンに対する加水分解率は反応時間の経過に伴い増大し、反応24時間における値は82%であった。
- (5) 供試菌株の生デンプン(タイ国産碎米)の分解活性の反応最適pHは3.2~3.5であった。
- (6) 供試菌株の各種生デンプン分解活性はウルチ米、タイ国産碎米及びもち米などで高い値を示し、小麦やとうもろこしにも比較的高い値を示した。しかし、生馬鈴薯デンプンに対する分解活性は著しく低い値を示した。

引用文献

- 1) 岩野君夫、三上重明、福田清治、椎木敏、島田豊明 1986 焼酎白麹の各種酵素の諸性質、醸協誌、81: 490~494.
- 2) S. Medda, B. C. Saha and S. Ueda 1982 Glucoamylase I of Black *Aspergillus*, J. Fac. Agr. Kyushu Univ., 26 (2.3) : 139~149.
- 3) 村上英也監修、注解編集委員会編 1984 第3回改正国税庁所定分析法注解、p.218, 462, 東京、(株)日本醸造協会.
- 4) 日本生化学会編 1975 生化学実験講座4, 糖質の化学 上, p.127, 東京、東京化学同人.
- 5) 布川弥太郎、岩野君夫、椎木敏 1981 泡盛こうじの酵素力分布、醸協誌、76: 354~355.
- 6) 椎木敏、岩野君夫、三上重明、福田清治 1986 焼酎白麹を用いる白米の無蒸煮発酵、醸協誌、82: 60~63.
- 7) 椎木敏、岩野君夫、三上重明、清水慎一郎 1987 各種無蒸煮穀類を用いる本格焼酎の製造、醸協誌、82: 651~654.

- 8) 照屋比呂子 1991 糖化後発酵による泡盛の製造に関する研究、平成2年度沖縄県産業振興基金補助事業、地域産業基盤技術研究開発事業報告書, p.190~211, 沖縄, (財)地域産業技術振興協会.
- 9) S. Toyama and K. Miyazato 1967 Studies on *Aspergillus awamori* II. On Some Properties of Amylase and Protease of *A. awamori* Isolated from Awamori Breweries, Sci. Bull. Coll. Agric. Univ. Ryukyus, 141 : 161~66.
- 10) 当山清善、石原昌信 1991 時間差麴を用いた泡盛の製造に関する研究、琉大農学報, 38 : 235~242.
- 11) S. Ueda, R. Ohba and S. Kano 1974 Fractionation of the Glucoamylase System from Black-Koji Mold and Effects of Adding Isoamylase and Alpha-Amylase on Amylolysis by the Glucoamylase Fractions, Die Stärke, 26 : 374~378.
- 12) S. Ueda and Y. Koba 1980 Alcoholic Fermentation of Raw Starch Without Cooking by Using Black-Koji Amylase, J. Ferment. Tech., 58 : 237~242.
- 13) S. Ueda, C. T. Zenin, D. A. Monteiro and Y. K. Park 1981 Production of Ethanol from Raw Cassava Starch by a Nonconventional Fermentation Method, Biotechnol. Bioeng., 23 : 291~299.
- 14) M. Yasuda, M. Kuwae and H. Matsushita 1989 Purification and Properties of Two Forms of Glucoamylase from *Monascus* sp. No. 3403, Agric. Biol. Chem., 53 : 247~249.
- 15) 安田正昭、佐藤充宏、坂口真樹、石原昌信、当山清善 1991 優良泡盛麴菌の検索と製麴条件の検討、琉大農学報, 38 : 255~262.