

琉球大学学術リポジトリ

酵素による生甘藷組織の分解(農芸化学科)

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: 当山, 清善, 石原, 昌信, 与那覇, 和雄, Toyama, Seizen, Ishihara, Masanobu, Yonaha, Kazuo メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3889

酵素による生甘藷組織の分解

当山清善*・石原昌信*・与那覇和雄*

Seizen TOYAMA, Masanobu ISHIHARA and Kazuo YONAHARA : Enzymatic degradation of raw sweet potato tuber tissues

Summary

The enzymatic degradation of the raw sweet-potato tuber-tissues was examined. As the result of screening test, the crude enzymes of *Asp. saitoi* and *Asp. niger* were found to degrade the raw sweet-potato tuber-disks so strongly to cause maceration of these tissues. Among the strains used in this experiment, *Asp. saitoi* gave the highest macerating activity. The degree of degradation of the raw sweet-potato disks and pectin from citrus was dependent upon the enzyme concentration and incubation time. The minced, raw sweet-potato tuber-tissues was liquefied by an addition of the enzyme from *Asp. niger* and not by that of enzymes from *Asp. saitoi*. The enzymes from *Asp. niger* showed a higher activity against filter paper (FP) and carboxymethylcellulose than those of *Asp. saitoi* did. The combined action of *Asp. saitoi* enzyme and Meicelase could not accelerate the degradation of pectic substances in the tuber tissues. On the other hand, with this combination of enzymes, the minced tuber tissues were almost completely macerated and liquefied.

緒 言

甘藷及びキャッサバ柔組織中の澱粉は、セルロースを主成分とする細胞壁によって包まれて存在しており、細胞壁間はペクチン質物によって接着されているものと考えられている^{3,4)}。従って、酵素を用いて組織中の澱粉を分解・糖化するためには、ペクチン質物を分解して細胞を分解せしめるとともに、細胞壁を分解して澱粉を遊離させることが必要である。山本⁹⁾らは、半固形状の甘藷磨砕物にペクチンデポリメラーゼを作用させると甘藷組織が崩壊・液状化され、澱粉の分解・糖化が促進されることを見出し、酵素利用による生甘藷からの省エネルギー的アルコール生産方式を開発した。著者^{12,13)}らは、生甘藷磨砕物にペクチナーゼ剤と澱粉糖化酵素を同時に添加した系においても澱粉の分解・糖化は不十分であることを観察し、澱粉を短時間で効率よく分解するにはペクチナーゼ剤で組織を崩壊・液状化するとともに耐熱性 α -アミラーゼ存在下で加温処理 (80°C, 10分間) することにより液化する工程が不可欠であることを報告した。Chua¹¹⁾らは、甘藷磨砕物と高濃度のアミラーゼ剤(グルコザイム6000)を混合したものに酵母を添加して無蒸煮によるアルコール発酵を行なった結果、組織中の澱粉は完全に分解・糖化され、順調にアルコール発酵が進行することを報告している。しかし、供試アミラーゼ剤の酵素系や甘藷組織の崩壊・液状化程度については、詳しくは説明されていない。そこで本研究では、生甘藷磨砕物の無蒸

*琉球大学農学部農芸化学科

煮アルコール発酵を行なうに当り、甘藷組織の酵素による崩壊・液状化機構を明らかにする必要があると考え、組織崩壊酵素活性の強い微生物（糸状菌）を検索するとともに、本酵素活性と甘藷磨砕物の液状化との関係について調べた。

実験方法

(1) **甘藷**：甘藷は沖縄県産品種を用い、剥皮して実験に供した。甘藷の澱粉価(平均28)は前報¹²⁾に従って求めた。

(2) **酵素剤**：酵素剤にはセルラーゼ、ヘミセルラーゼ及びペクチナーゼ活性を有するメイセラゼ(明治製菓株)を用い、濃度が0.5% (W/V) になるように蒸留水に溶解して調製した。

(3) **供試菌株の培養**：実験には研究室保存の麹菌等の糸状菌30株を用いた。培地の調製は、小麦麴 8 g を小型シャーレに採り、水道水 8 ml を混合した後、120°C で20分間加圧・蒸気殺菌して行なった。菌株の培養は、ポテト抽出液で斜面培養した各種供試菌株に殺菌水を注いで白金耳で孢子を採取・懸濁した液を上記培地に接種し、30°C で5日間静置して行なった。

(4) **粗酵素液の調製法**：酵素液の抽出は、培養が終了した麴麩に麴重量の2倍量の蒸留水を加えて室温で60分間保持し、時々攪拌しながら行なった。濾過して得られた抽出液は、遠心分離により夾雑物を除去し、粗酵素液として用いた。

(5) 酵素活性の測定法

(a) **生甘藷崩壊活性**：酵素反応液の組成は、甘藷の中央部より直径20mm、長さ10mmに切った円筒形の甘藷切片を試験管に採り、1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5) 0.5ml、0.1%窒化ナトリウム0.5ml及び酵素液で総量を5 mlとした。酵素反応は、40°C で24時間ゆるやかに振とうして行ない、反応後残存した甘藷切片の湿重を測定して重量減少率を次式により求めた。

$$R = (W_0 - W_T) / W_0 \times 100$$

R ; 重量減少率

W_0 ; 反応前の甘藷重量 (g)

W_T ; 反応後の甘藷重量 (g)

(b) **生甘藷液化活性**：生甘藷の液状化反応は、5NHCl で pH 4.5に調製した生甘藷磨砕物100 g にピロ亜硫酸カリウム0.01 g 及び酵素液10mlを加えたのち40°C で攪拌して行なった。酵素反応後、所定量の反応物を小型試験管に注ぎ込み、水道水で一定容量にしたのち沈澱した反応残渣の高さを測定した。液状化活性は、反応物の高さを50%減少せしめる酵素量で表示した。

$$L = (H_0 - H_T) / H_0 \times 0.5$$

L ; 液状化活性

H_0 ; 反応前の甘藷磨砕物の高さ (cm)

H_T ; 反応後の甘藷磨砕物の高さ (cm)

また、酵素反応液中の還元糖量はソモギー・ネネルソン法、グルコースはグルコースオキシダーゼキット法、ガラクトロン酸量はチオバルビツール酸及びカルバゾール法によりそれぞれ測定した。

(c) **ペクチン分解活性**：酵素反応混液は、0.5%ペクチン(シトラス) 0.4mlに1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5) 0.1ml及び酵素液を加えて総量を1.0mlとした。酵素反応は40°C で60分間保って行ない、反応で生じた還元糖量をソモギー・ネルソン法で測定した。

(d) **アビセルセルロース分解活性**：アビセルセルロース10mgを基質として用い、(c)と同様な操作で酵素反応を行ない、反応で生成した還元糖量を測定した。

(e) **CM-セルロース及びキシラン分解活性**：(c)と同様に、0.5%基質溶液を用いて酵素反応を行ない、反応混液中の還元糖量を測定した。

実験結果

1. 各種麹菌における生甘藷崩壊酵素活性の分布

Table 1 は、生甘藷組織を分解する酵素活性が高い菌株を検索する目的で、各種糸状菌を麹固形培地に接種し、30°Cで5日間培養を行なった後、前述の方法で調製した麴抽出液について生甘藷崩壊活性及び反応混液中の還元糖量を測定した結果である。供試菌株から調製した麴抽出液にはいずれにも甘藷崩壊活性が認められ、*Asp. niger*, *Asp. usamii*, *Asp. awamori*, *Asp. aureus* 及び *Asp. saitoi* 等に高い活性がみられた。特に、*Asp. niger* 3280及び *Asp. saitoi* 3295菌株は極めて高い活性を有しており、生甘藷切片が粉状になるまで分解した。両酵素反応液では還元糖量の増加がみられ、これは、甘藷組織細胞中の澱粉が混在するアミラーゼによって分解されたことによるものと考えられる。以下の実験では、甘藷崩壊活性が比較的高かった両菌株について生甘藷組織分解性を詳しく調べた。

Table 1. Distribution of sweet potato tubers—disks degradation activity in various strains of mold

Strains	Degradation (%)	Reducing sugar (mg/ml)	Strains	Degradation (%)	Reducing sugar (mg/ml)
<i>Rhizopus oryzae</i> 3056	59.6	33.2	<i>Aspergillus aureus</i> 3291	92.4	32.6
<i>javanicus</i> 3063	54.8	13.1	<i>aureus</i> 3293	79.5	24.3
<i>delemar</i> 3060	38.5	16.1	<i>aureus</i> 3294	96.1	20.7
<i>Aspergillus oryzae</i> 3117	33.4	29.0	<i>Aspergillus saitoi</i> 3295	100	32.1
<i>japonicus</i> 3107	26.2	44.3	<i>saitoi</i> 3296	93.3	13.2
<i>sojae</i> 3111	13.9	21.6	<i>saitoi</i> 3297	89.4	39.8
<i>Aspergillus niger</i> 3121	95.3	40.7	<i>Penicillium notatum</i> 3301	49.4	16.9
<i>niger</i> 3125	92.1	43.8	<i>notatum</i> 3302	73.6	29.4
<i>niger</i> 3280	100	40.0	<i>notatum</i> 3303	83.9	11.9
<i>Aspergillus usamii</i> 3109	84.3	45.2	<i>Trichoderma viride</i> 3603	6.2	1.0
<i>usamii</i> 3200	99.2	44.8	<i>viride</i> 3604	17.4	5.8
<i>usamii</i> 3202	98.4	45.1	<i>viride</i> 3700	46.7	25.7
<i>Aspergillus awamori</i> 3136	80.2	34.4	<i>Mucor javanicus</i> 3021	65.0	13.5
<i>awamori</i> 3138	87.1	37.1	<i>Monascus sp.</i> 3404	6.4	2.5
<i>awamori</i> 3147	94.0	41.7	<i>Neurospora sitophila</i> 3450	23.7	11.4

The conidia of mold were collected by adding 5 ml of sterilized distilled water in the slant culture and was inoculated to a 8 g of wheat-bran containing 8 ml of tap water in the petri dish which was previously autoclaved at 120°C for 20 min. After 4 days incubation at 30°C, which were added distilled water double. The extraction of enzyme from wheat-bran Koji was carried out at 25°C for 1 hr with an interval shaking. The enzyme solution was prepared from wheat-bran-Koji extraction by centrifugation. Enzyme-reaction mixture contained 0.5 ml of 1 M sodium acetate buffer of pH 4.5, sweet-potato disks (2φx 1 cm), 0.5 ml of 0.1% potassium pyrophosphate and the crude enzyme solution in a final volume of 5.0ml. After incubation at 40°C for 24 hr, the weight loss of sweetpotato disks and reducing sugar increased were determined. The rate of weight loss was calculated from the following equation.

$R = (W - W_T) / W_X \cdot 100$, R; rate of weight loss, w; weight of potato disks before incubation, w_t; weight of potato disks after incubation.

2. 甘藷崩壊性及びペクチン分解法に及ぼす酵素濃度の影響

植物柔組織の酵素による崩壊現象は、主にペクチナーゼと呼ばれる酵素群の作用によって引き起こされることが認められている^{3,4)}。そこで、*Asp. saitoi* 及び *Asp. niger* 酵素による甘藷崩壊活性とペクチン分解活性に相関があるかどうかを調べるために、両酵素の濃度を変化させて生甘藷崩壊性及びペクチン分解性を比較したのが Fig. 1 である。両酵素による生甘藷の崩壊性及びペクチン分解性は酵素濃度と

ともに増大した。両酵素反応系で、生甘藷の崩壊とペクチン分解は極めて類似した分解曲線を示したことから、ペクチナーゼが生甘藷崩壊に関与しているものと推測された。酵素濃度が低い反応系においては、*Asp. saitoi* 酵素は、*Asp. niger* 酵素に比べて甘藷崩壊性で1.5~2倍、ペクチン分解性で約2.5倍高いことがわかった。

3. 酵素による生甘藷磨砕物の液化化

Asp. saitoi 及び *Asp. niger* 酵素は、極めて高い生甘藷崩壊活性を有していることがわかったので、次に、両酵素添加により無加水のまま生甘藷磨砕物が崩壊・液化化するかどうかについて調べた (Fig. 2)。酵素反応は、甘藷磨砕物に各粗酵素液を加え、pH 4.5、40°Cに保って行ない、経時的に液化化活性を測定した。その結果、*Asp. saitoi* 酵素では甘藷磨砕物の崩壊・軟化がみられたが、液化化現象は認められなかった。これに対して、*Asp. niger* 酵素では酵素反応時間の経過に伴ない崩壊とともに液化化がみられ、固形部と液部に分離することがわかった。これらの結果から、生甘藷の崩壊と液化化はそれぞれ異なる酵素の作用によって引き起こされる現象であることが明らかになった。

4. 酵素の基質特異性

生甘藷の崩壊・液化化に関与する酵素系を明らかにする目的で、甘藷組織の構成成分とみられるセルロース、ヘミセルロース及びペクチン等に対する酵素の作用について調べた (Table 2)。*Asp. saitoi* 酵素はペクチンを良好な基質とし、*Asp. niger* 酵素と比較して約1.5倍高い分解活性を示した。しかし、汙紙及びカルボキシメチルセルロース (CMC) に対する活性は、*Asp. niger* 酵素の約50%程度であった。アビセルセルロースやキシランに対する活性は酵素間で顕著な差異はみられなかった。

5. 生甘藷崩壊に及ぼすセルラーゼの影響

先の実験結果から、汙紙及びCMCに作用する酵素、いわゆるセルラーゼがペクチ

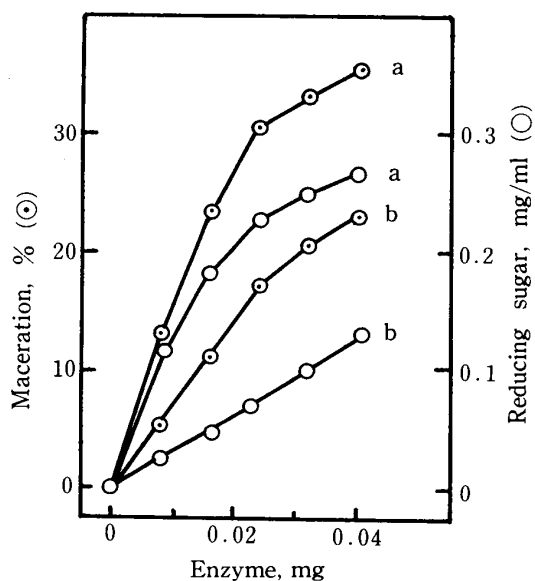


Fig. 1. Enzymatic degradation of sweet potato-tuber disks by the crude enzyme of *Asp. saitoi* and *Asp. niger*

Sweet-potato disks and 0.2% of pectin were incubated with various concentration of the enzymes of *Asp. saitoi* and *Asp. niger* at 40°C for 5 and 1 hr, respectively. After incubation, the rate of weight of potato disks and reducing sugar was determined. (a) *Asp. saitoi* enzymes (b) *Asp. niger* enzymes

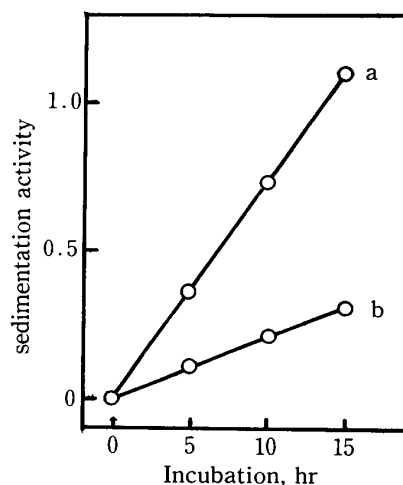


Fig. 2. Liquefaction of minced sweet potato tubers by the crude enzymes of *Asp. saitoi* and *Asp. niger*

Fifty grams of the minced raw sweet-potato tubers were incubated with the enzymes of *Asp. saitoi* and *Asp. niger* at pH 4.5 and 40°C for indicated times. After incubation, the remaining potato tubers were recovered by filtration through Toyo filter pater no. 2, and poured into a small test tube with tap water. The height of sedimentation was expressed as (initial height-residual height)/initial height x 0.5. (a) *Asp. saitoi* enzymes (b) *Asp. niger* enzymes

Table 2. Degradation of various substrates by the crude enzymes of *Asp. saitoi* and *Asp. niger*

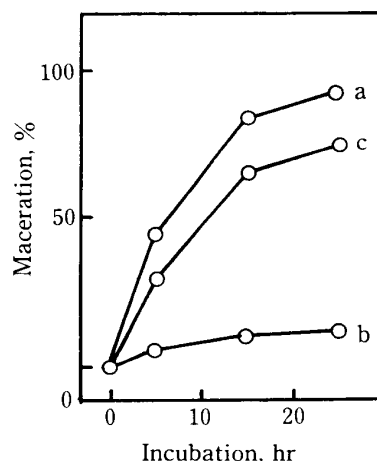
Substrates	<i>Asp. saitoi</i> enzyme	<i>Asp. niger</i> enzyme
	(formed reducing sugar, mg/ml)	
Pectin	0.48	0.32
Xylan	0.48	0.58
Carboxymethylcellulose	0.14	0.32
Filter paper	0.45	0.85
Avicel cellulose	0.08	0.10

The cellulase activity of the crude enzyme of *Asp. saitoi* and *Asp. niger* were measured with 15 mg of Toyo filter paper no. 2, 0.2% of CMC and xylan and 1% of Avicel cellulose in 0.1-M sodium acetate buffer of pH 4.5. The reaction mixture was incubated at 40°C by 3-hr shaking. The reducing sugar increased was determined. Other conditions are stated in the legend to Fig. 1.

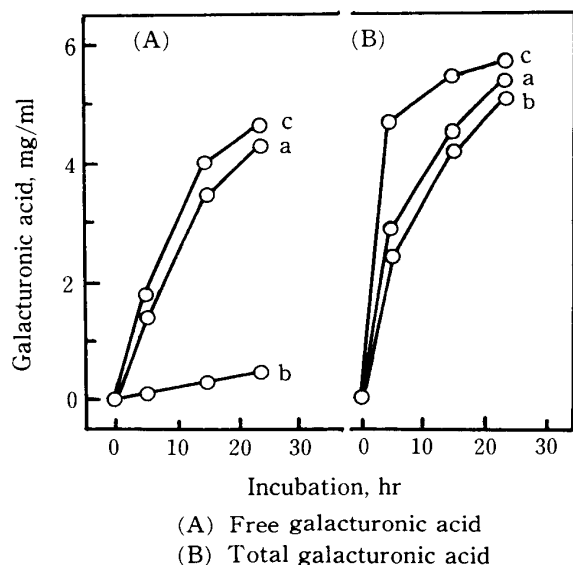
ナーゼとともに生甘藷・液状化に関与しているものと思われたので、セルロース分解力の強いセルラーゼ剤（メイセラゼ）と *Asp. saitoi* 酵素を用いて生甘藷の崩壊性について調べた (Fig. 3-1)。生甘藷組織は *Asp. saitoi* 酵素を単独に作用させることで著しく崩壊されたが、セルラーゼでは崩壊はほとんどみられなかった。また、

両酵素を同時に加えても崩壊の相乗効果は認められなかった。酵素反応液中のガラツロン酸量を調べた結果、セルラーゼ添加では遊離のガラツロン酸量の増加はみられなかったが、*Asp.*

(Fig. 3-1)



(Fig. 3-2)



(Fig. 3-3)

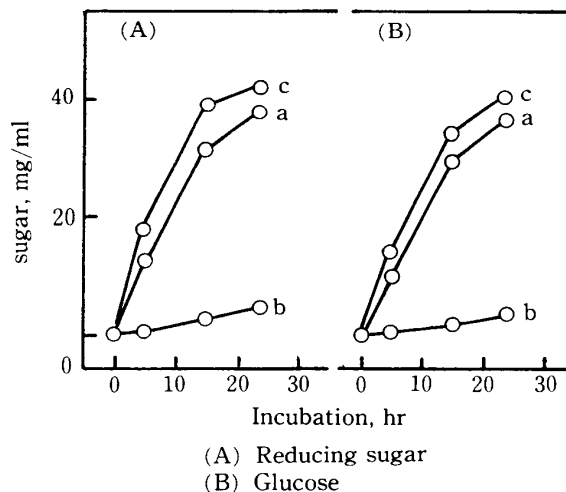


Fig. 3. Enzymatic degradation of sweet potato-disks by the crude enzymes of *Asp. saitoi* and Meicelase preparation

Sweet-potato disks were incubated with the enzymes of *Asp. saitoi* and Cellulase preparation, Meicelase, at pH 4.5 and 40°C for indicated times. *Asp. saitoi* enzymes and Meicelase were used separately, as well as in combination. After incubation, the rate of weight loss of potato disks (Fig. 3-1), uronic acid (Fig. 3-2) and sugar (Fig. 3-3) formed were determined. Glucose was determined by a glucose oxidase kit method. Total galacturonic acid and free galacturonic acid were determined with the carbazole method and the thiobarbituric acid test, respectively. (a) *Asp. saitoi* (b) Meicelase (c) *Asp. saitoi* + Meicelase

saitoi 酵素を加えることにより著しく増加した。両酵素を同時に加えてもガラクトuron酸量は、*Asp. saitoi* 酵素単独の時とほぼ同じであった。しかし、酵素反応液中の全ガラクトuron酸量を測定した結果、セルラーゼを加えた場合には酵素反応時間の経過とともに全ガラクトuron酸量は増加し、*Asp. saitoi* 酵素を加えた時の遊離ガラクトuron酸量に匹敵した (Fig. 3-2)。従って、セルラーゼ標品には生甘藷組織のペクチン質的に作用して高分子ペクチンを可溶化せしめる酵素の存在が示唆された。酵素反応液中の還元糖量及びグルコース量を測定した結果を Fig. 3-3 に示した。セルラーゼ単独では還元糖量及びグルコースの生成量は少なかったが、*Asp. saitoi* 酵素では反応時間の経過に伴ない著しく増加した。これは、甘藷組織の崩壊に伴なって遊離した澱粉が酵素 (アミラーゼ) によって分解・糖化されたことを示している。セルラーゼと *Asp. saitoi* 酵素を混合して作用させても、還元糖量及びグルコース量は *Asp. saitoi* 酵素単独の場合とほとんど同じ値であった。これらの結果から、生甘藷組織の崩壊は主にペクチナーゼによって行われ、セルラーゼはほとんど関与しないことが明らかとなった。

6. 生甘藷の液状化に及ぼすセルラーゼの影響

次に、セルラーゼが生甘藷組織の液状化に寄与しているかどうかを調べたのが Fig. 4 である。生甘藷磨砕物にセルラーゼ及び *Asp. saitoi* 酵素を加え、pH 4.5、40°Cで酵素反応を行ない、液状化の程度を測定した。結果より、セルラーゼ及び *Asp. saitoi* 酵素単独では生甘藷磨砕物の液状化はみられなかったが、両酵素を同時に添加すると明らかに液状化がみられ、固液分離が認められた。また、液状化の進行に伴ない澱粉粒の遊離がみられ、澱粉は酵素によって分解・糖化されることが確かめられた。

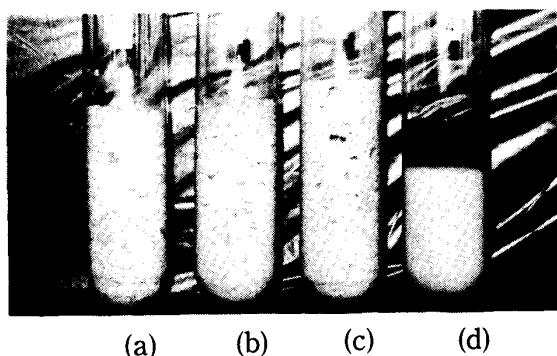


Fig. 4 Degradation of the minced raw sweet potato tubers by the enzyme of *Asp. saitoi* and Meicelase preparation

The minced potato tubers were incubated with the enzymes of *Asp. saitoi*, Meicelase and the combination of *Asp. saitoi* enzymes and Meicelase at pH 4.5 and 40°C for indicated times. (a) control (b) *Asp. saitoi* (c) Meicelase (d) *Asp. saitoi* + Meicelase

考 察

植物組織の崩壊 (マセレーション) に関与する酵素群については古くから研究が行われており、食品分野等へ広く利用されている^{5,7,8,10}。近年、甘藷等の澱粉質物に酵素を加えて、組織を崩壊・液状化せしめることにより澱粉粒の酵素糖化を促進させ、無蒸煮でアルコール発酵の原料に供するための研究が行われている^{2,6,14,15}。本報では、生甘藷組織の崩壊・液状化に関与する酵素系を明らかにする目的で、生甘藷組織崩壊活性の高い麹菌を選出し、本酵素活性と液状化との関係について調べた。各種麹菌の酵素について生甘藷切片崩壊活性を調べた結果、*Asp. saitoi* 3295及び *Asp. niger* 3280が比較的高い活性を有していることがわかった。*Asp. saitoi* 酵素は *Asp. niger* 酵素より甘藷崩壊及びペクチン分解活性が高かった。しかし、*Asp. saitoi* 酵素では生甘藷磨砕物の崩壊・軟化はみられたが、液状化は認められないのに対し、*Asp. niger* 酵素では磨砕物は崩壊するとともに液状化されることが明らかになった。従って、生甘藷組織の崩壊及び液状化はそれぞれ異なった酵素作用によって行なわれるものと考えられる。次に、両酵素のセルラーゼ活性及びペクチナーゼ活性を比較した結果、*Asp. saitoi* 酵素は *Asp. niger* 酵素よりペクチン分解活性が高く、沔紙及びCMC糖化活性は低いことがわかった。外山¹¹らは、馬鈴薯切片に

細胞遊離酵素を作用させると組織の崩壊が起こり、これに汙紙崩壊セルラーゼを加えると澱粉粒を囲んでいる細胞壁が分解され、澱粉粒が放出されることを報告している。本実験においても、*Asp. niger* 酵素を作用させると甘藷組織の崩壊・液状化に伴ない澱粉粒の遊離が観察されたことから、甘藷磨砕物の崩壊、液状化にはペクチナーゼとセルラーゼが関与しているものと考えられる。ペクチナーゼ活性の高い *Asp. saitoi* 酵素と市販セルラーゼ剤（メイセルラーゼ）を用いて生甘藷組織の崩壊・液状化について調べた結果、生甘藷の崩壊は、主にペクチナーゼによって引き起こされ、セルラーゼはほとんど関与しないことがわかった。セルラーゼ標品には、セルラーゼ活性の他にペクチンを可溶化する酵素の存在が認められたが、本酵素は甘藷切片の崩壊に関与していないものと思われる。同様に、生甘藷磨砕物に対する *Asp. saitoi* 酵素及びセルラーゼの作用について調べた結果、それぞれの酵素単独では甘藷組織の液状化はみられなかったが、両酵素を同時に添加すると液状化されることが明らかになった。組織の崩壊・液状化に伴ないガラクトロン酸及び還元糖量が増加した。還元糖量の増加は、主として組織中の澱粉が酵素分解されたことによる。これらの結果から、生甘藷磨砕物の崩壊は、主としてペクチナーゼによって引き起こされ、液状化はペクチナーゼとセルラーゼの協同作用によって起こる現象であると考えられる。

要 約

生甘藷組織の酵素による崩壊・液状化機構を明らかにする目的で、各種糸状菌の麹麴から調製した酵素液について生甘藷崩壊活性を調べるとともに、本酵素活性と生甘藷組織の液状化との関係について調べた。

各種糸状菌の生甘藷崩壊活性が認められ、中でも *Asp. saitoi* 3295及び *Asp. niger* 3280に高い活性がみられた。両菌株酵素による生甘藷及びペクチン分解性は酵素濃度と酵素反応時間に比例して増加した。*Asp. saitoi* 酵素では生甘藷磨砕物の液状化はみられなかったが、*Asp. niger* 酵素で液状化がみられた。*Asp. saitoi* 酵素は、*Asp. niger* 酵素よりも生甘藷崩壊及びペクチン分解性が高かったが、汙紙及びCMC糖化活性は低かった。*Asp. saitoi* 酵素とセルラーゼを同時に加えても生甘藷の崩壊は促進されなかった。しかし、セルラーゼ標品は生甘藷組織に作用し、高分子ペクチンを可溶化した。生甘藷磨砕物に *Asp. saitoi* 酵素及びセルラーゼを単独で添加しても液状化はみられなかったが、両酵素を同時に加えると液状化することが明らかになった。

本研究の実施に協力された片山功君に感謝します。

引用文献

1. Chua. J. W., Fukui. N., Wakabayashi. Y., Yoshida. T., Taguchi. H. 1984 Enzymatic hydrolysis of sweet potato for energy-saving production of ethanol. J. Ferment. Technol. **62** : 123—130
2. Hayashida. S., Ohta. K., Flor. P. Q., Nanri. N., Miyahara. I. 1982 High concentration-ethanol fermentation of raw ground corn. Agri. Biol. Chem. **46** : 1947—1950
3. 石井茂孝, 川村敏, 横塚保 1970 植物組織の酵素的分解に関する研究(第3報) *Aspergillus sojae* No.48 の生産する Pectolytic enzymes 農化 **44** : 299—305
4. 石井茂孝, 川村敏, 横塚保 1970 植物組織の酵素的分解に関する研究(第4報) *Aspergillus sojae* No.48 の macerating activity について 農化 **44** : 306—311
5. 梶 明, 藤川勇, 岩原章二郎, 佐藤優行 1972 *Bacillus* sp. F-11 のペクチン分解酵素による植物組織の崩壊作用 農化 **46** : 509—516

6. Matsuoka. H., Koba. Y., Ueda. S. 1982 Alcoholic fermentation of sweet potato without cooking. *J. Ferment. Technol.* **60** : 599—602
7. Markovič. A., Slezárik. A., Labudová. I. 1985 Purification and characterization of pectinesterase and polygalacturonase from *Trichoderma reesei*. *FFMS Microbiology Letters* **27** : 267—271
8. Suga. Y., Kawai. M., Noguchi. S., Shimura. G., Samejima. H. 1978 Application of cellulolytic and plant tissue macerating enzyme of *Irpex lacteus* Fr. as feed additive enzyme. *Agric. Biol. Chem.* **42** : 347—350
9. Svendsby. O., Kakutani. K., Matsumura. Y., Iizuka. M., Yamamoto. T. 1981 Ethanol fermentation of uncooked sweet potato with the application of enzyme. *J. Ferment. Technol.* **59** : 485—487
10. Sreenath. H. K., Kogel. F., Radola. B. J. 1986 Macerating properties of a commercial pectinase on carrot and celery. *J. Ferment. Technol.* **64** : 37—44
11. 外山信男, 藤井昇, 小川喜八郎 1965 細胞分離酵素と cellulase による甘藷澱粉の製造 (第 1 報) 甘藷, 澱粉生粕および乾燥粕に対する酵素剤の作用 *醸工* **43** : 756—765
12. 当山清喜, 石原昌信, 与那覇和雄, 大久保勉 1983 生甘藷の酵素による糖化とアルコール発酵 *琉大農学報* **30** : 185—192
13. 当山清喜, 石原昌信, 与那覇和雄, ス久保勉 1984 酵素剤利用による甘藷芋からのエタノール生産 *琉大農学報* **31** : 35—42
14. Ueda. S., Koba. Y. 1980 Alcoholic fermentation of raw starch without cooking by using Black—Koji amylase. *J. Ferment. Technol.* **58** : 237—242
15. Yusaku. F., Puangpen. S., Poonsook. A., Ueda. S. 1984 Alcoholic fermentation of raw cassava starch by *Rhizopus Koji* without cooking. *Biotechnology and Bioengineering* **26** : 315—319