

## クエン酸麹中の糖化酵素と耐酸性 - アミラーゼ

著者	菅沼 俊彦, 西山 重幸, 北原 兼文, 永浜 伴紀
雑誌名	鹿児島大学農学部學術報告=Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University
巻	45
ページ	29-35
別言語のタイトル	Glucoamylase and Acid-stable $\alpha$ -Amylase in Koji for Citric Acid Production
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10232/1589">http://hdl.handle.net/10232/1589</a>

## クエン酸麴中の糖化酵素と耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ

菅沼 俊彦・西山 重幸・北原 兼文・永浜 伴紀

(応用生物化学講座)

平成6年8月10日 受理

### Glucoamylase and Acid-stable $\alpha$ -Amylase in Koji for Citric Acid Production

Toshihiko SUGANUMA, Shigeyuki NISHIYAMA, Kanefumi KITAHARA and Tomonori NAGAHAMA

(Laboratory of Biochemistry and Biotechnology)

#### 緒 言

現在、澱粉からグルコース製造のプロセスにおいて、液化用アミラーゼと糖化用アミラーゼの作用pHが異なるため、煩雑なpH調整が行なわれている。すなわち、まず澱粉スラリーのpH(4.0-5.0)をアルカリで中性(6.0-6.5)に調整し、細菌由来の $\alpha$ -アミラーゼを用いて液化をまず行った後、再びpHを酸性(4.5)に下げ、カビ由来(主に *Rhizopus*)のグルコアミラーゼによる糖化を行っている。副産物のマルチュロースの生成の観点からも中性域以上でその生成が顕著となり、すべての糖化のプロセスをpH 6以下の酸性域で行なうことが望ましい<sup>1)</sup>。したがって、糖化過程と同じ酸性域で作用する $\alpha$ -アミラーゼの開発が期待されている。

pH 6以下の酸性域で作用する $\alpha$ -アミラーゼとしては、細菌では *Bacillus licheniformis* の $\alpha$ -アミラーゼ<sup>1,2)</sup>が最近見いだされている。また、カビ起源では *Aspergillus niger* の酸性 $\alpha$ -アミラーゼが古くより知られている<sup>3)</sup>が、いまだに糖化工業用には実用化されていない。

本県は甘藷澱粉粕などを原料としたクエン酸発酵工業が盛んである。*A. niger*の一変異株を用いたクエン酸麴は、クエン酸生成と同時にアミラーゼを分泌している<sup>4)</sup>が、現在は有効な回収法がないために捨てられている。この麴抽出液のpHは2.5とかなり低いので、それに含まれる酵素は耐酸性に富むことが予想される。本研究ではこれら工業用酵素として優れた特質を持つと期待されるクエン酸麴アミラーゼの種類と性質を明らかにし、それを有効に回

収するシステムを呈示するのを目的とする。

#### 材料と方法

本実験の原料として用いたクエン酸麴は固体培養6日出麴時の蒸気殺菌していない麴(サツマ化工(株), 30g)である。家庭用ミキサーで80mlの純水とともに軽くホモゲナイズし、4重ガーゼで絞って水抽出液(67ml)を得た。それを限外濾過膜(アミコン社, YM10)を用いて濃縮し、さらに40mM酢酸緩衝液(酢酸カルシウム1mg/mlを含む)に対して透析したものを濃縮粗酵素液(13ml)とした。

アミラーゼ活性は0.1mlの2%可溶性澱粉(平均重合度38.5, 40mM酢酸緩衝液, pH4.0)に0.1mlの適当に希釈した上記粗酵素液を加え、37°Cで10分間反応させた後、還元力増加をソモジ・ネルソン法<sup>5)</sup>(SN法)で定量して全アミラーゼ活性とした。また、同時に生成グルコースをグルコース・オキシダーゼ法<sup>6)</sup>(GO法)で定量してグルコアミラーゼ活性とした<sup>7)</sup>。その他の酵素活性も含めて、1分間に1  $\mu$ moleの生成物を生じる酵素量を1酵素単位(ユニット, U)とした。pH依存性実験などの広域pH調整用には、McIlvaine緩衝液を用いた。蛋白量は牛血清アルブミンを標準蛋白としてローリ法変法<sup>8)</sup>で定量した。全糖量はフェノール硫酸法<sup>9)</sup>で求めた。

生澱粉分解活性には脱脂したワキシコーン・スターチを用いた。生澱粉50mgをL字型試験管に入れ、5mlの酵素液(10U, 40mM酢酸緩衝液, pH4.0)で懸濁し、30°Cで振盪(50rpm)させた。3.5時間と7時間後に遠心分離(5000rpm, 10min)し

た上澄み液の可溶性糖をフェノール硫酸法で測定した。

反応生成物のアノマー分析は HPLC で行なった。すなわち、変旋光の影響をできるだけ除くために、多めの酵素量 (0.2 U/ml) を用い、反応時間をできるだけ短く (2 分間) して、簡易限外濾過器 (ミリポア社, モルカット L) で除蛋白後、すみやかに液クロカラムにインジェクトした。カラムは YMC 社 AQ 304 を用い<sup>10)</sup>, 0.02% の  $\text{NaN}_3$  を含む蒸留水で溶出した。糖のピークは示差屈折計 (KNAUER Nr. 98.00) で検出した。

クエン酸麹から精製した耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ標品 (比活性, 10.6 U/mg) は九州化工(株)犬塚孝治氏より恵受を受けた。中性  $\alpha$ -アミラーゼは *A. oryzae* 由来 (Type X.A) のものでシグマ社から購入した。

## 結 果

### 1. クエン酸麹酵素液中のアミラーゼ活性

クエン酸麹からの粗酵素液に含まれる全アミラーゼ活性, グルコアミラーゼ活性,  $\alpha$ -及び $\beta$ -グルコシダーゼ活性ならびにセルラーゼ活性測定法を Table 1 に示す。濃縮粗酵素液 ml 当り約 12 U の全アミラーゼ活性が認められた。麹 g 当りに換算すると約 5 U であった。可溶性澱粉を基質として用いた時, カビ起源の  $\alpha$ -アミラーゼでは実質上ほとんどグルコースを生成しないため, グルコースの生成はもっぱらグルコアミラーゼの作用であるとみなせる<sup>7)</sup>。したがって, 生成還元糖量 (SN 法) に対する生成グルコース量 (GO 法) から判断して, 90% がグルコアミラーゼ活性であり, 残り 10% が  $\alpha$ -アミラーゼ活性に基づくと考えられる。合成基質 (パラニトロフェニル  $\alpha$ -グルコシド) を用いて測定した  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は微弱 (アミラーゼ活

性の 0.1% 以下) ながら検出された。なお, サリシンを基質として測定した  $\beta$ -グルコシダーゼ (セロビアーゼ) 活性や, 濾紙崩壊や, CMC-セルロース, アビセルを基質としたセルラーゼ活性は検出されなかった。

クエン酸麹粗酵素液の生澱粉に対する消化力を測定したところ活性が認められた。しかし, 他の *Rhizopus* 起源の粗グルコアミラーゼ (ナガセ社) に比べ, 単位アミラーゼ活性当りの生澱粉消化能は約半分であった (Fig. 1)。

### 2. 麹酵素液中の耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの確認

クエン酸麹粗酵素液のアミラーゼ活性の pH 依存性を Fig. 2 に示す。測定した全 pH 領域で, SN 法と GO 法の値がほぼ一致したのでアミラーゼ活性は

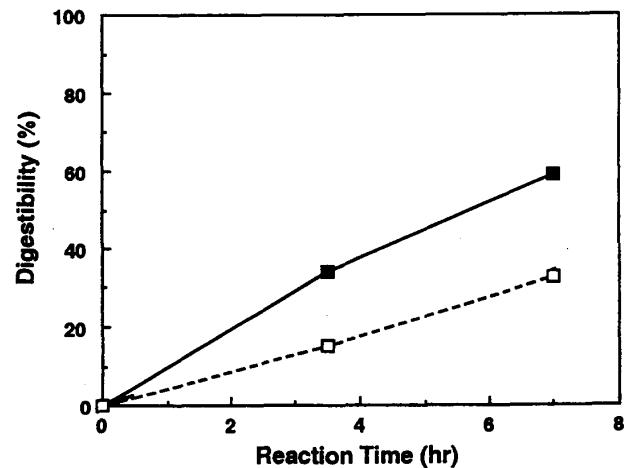


Fig. 1. Digestion of raw starch by glucoamylase from *Rhizopus* (Nagase) (■) and the crude enzyme from the citric acid-koji (□). The reaction was performed on a shaker (50rpm) in 40mM acetate buffer, pH 4.0, at 30 °C. See text for details.

Table 1. Amylases and glycosidases in the crude enzyme extracted from koji for citric acid production

Enzyme	Substrate	Determination	Activity(U*1/ml)
The total amylase	1% soluble starch	Somogyi-Nelson	11.9
Glucoamylase	1% soluble starch	glucose oxidase	11.0
Maltase	1% maltose	glucose oxidase	1.76
$\alpha$ -Glucosidase	2mMPNP- $\alpha$ -glucoside*2	OD410	0.0085
$\beta$ -Glucosidase	0.5% salicin	Somogyi-Nelson	not detected
Cellulase	0.5% CM-cellulose*3	Somogyi-Nelson	not detected

\*1 Enzyme unit ( $\mu$ mole/min)

\*2 *p*-Nitrophenyl  $\alpha$ -glucoside

\*3 Carboxymethyl-cellulose

All activities were measured in 40mM acetate buffer, pH 4.5, at 37° C.

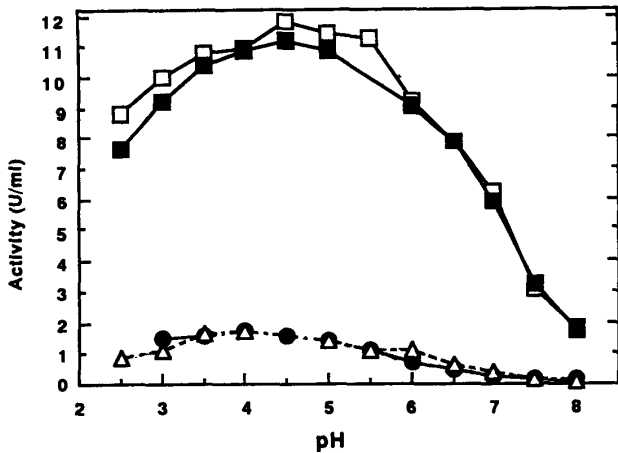


Fig. 2. pH-Dependency of amylase (□), (■), maltase (●) and  $\alpha$ -glucosidase ( $\triangle$ ) of crude enzyme from citric acid-koji. The total amylase-activity (□) and glucoamylase-activity (■) were determined at 37 °C by Somogyi-Nelson method and glucose-oxidase method, respectively, using soluble starch as a substrate. Activity of  $\alpha$ -glucosidase was expressed as 20 times enzyme unit ( $\mu$  mole/min).

大部分がグルコアミラーゼに基づいているのが分かる。後述するように通常の中性 $\alpha$ -アミラーゼはpH 2.5ではほぼ失活する。そのpHにおいて、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの活性を全アミラーゼ活性とグルコアミラーゼ活性の差として算出すると、全アミラーゼ活性の7~8分の1がそれに相当する。

### 3. クエン酸麹 $\alpha$ -アミラーゼの性質

クエン酸麹酵素液より硫酸分別、FPLCなどで分離・精製した $\alpha$ -アミラーゼ標品を用いて通常のカビ起源の中性 $\alpha$ -アミラーゼ (*A. oryzae* 起源, シグマ社) の性質と比較した。麹粗酵素液 (上述のごとく大部分がグルコアミラーゼと見做せる) の性質も同時に比較した。

#### (1) 生成物のHPLC分析

クエン酸麹 $\alpha$ -アミラーゼ精製標品と中性 $\alpha$ -アミラーゼの可溶性澱粉 (重合度約300) に対する作用特異性を調べるために分解生成物をHPLCで分析した。結果をFig. 3に示す。このカラム (YMC社, AQ 304カラム) はマルトトリオースより大きいオリゴ糖について $\alpha$ ,  $\beta$ -アノマーの2つのピーク ( $\beta$ ,  $\alpha$ の順で溶出) を与える<sup>10)</sup>。両酵素による生成物のアノマーはいずれも $\alpha$ 型であるのが分かる。また、各ピークの相対的大きさが両酵素ともよく似

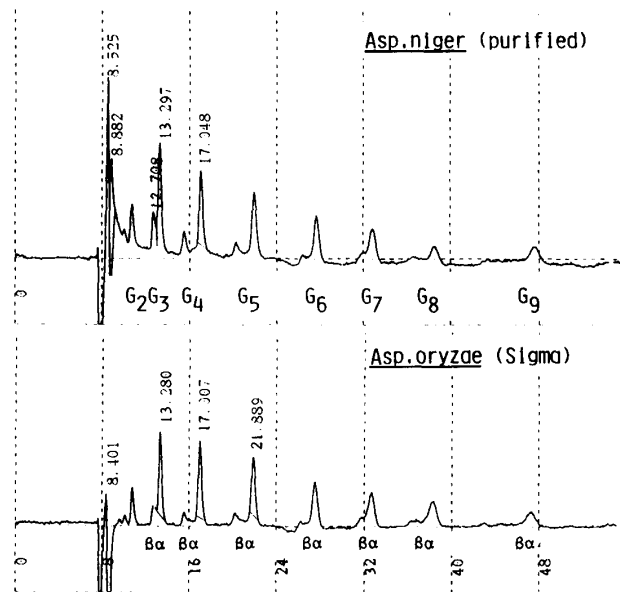


Fig. 3. HPLC analysis for determination of anomer type of the products. The enzyme reactions were performed in 40mM acetate buffer, pH 4.0 at 37 °C (the purified enzyme from citric acid-koji, upper) or pH 5.0 at 30 °C (the commercial enzyme from *Asp. oryzae*, lower). Soluble starch was used as a substrate. See text for details.

た生成物パターンを示している。

精製標品のグルコアミラーゼの混在を調べるため、pH 4.0で可溶性澱粉に作用させたときの分解物をSN法とGO法で測定した。生成還元糖の1.4%がグルコースにすぎず、グルコアミラーゼの混在は無視できると見做せた。

#### (2) 活性の至適pHとpH安定性

中性 $\alpha$ -アミラーゼはpH 4.5から5.5で最大活性を示し、pH 3.5付近で活性が約半分減少した (Fig. 4)。一方、クエン酸麹 $\alpha$ -アミラーゼ精製標品ではpH 3.5から4.5で最大活性を示し、pH 2.5付近で活性が約半分になった。麹粗酵素液のアミラーゼ活性のpH依存性はpH 5.0付近で最大活性を示し、前2者に比べると幅広い活性のpH依存曲線を示した。

酵素を種々のpHで37°C, 5時間処理した後の残存活性を、至適pH条件下で測定した。その結果 (pH安定性) をFig. 5に示す。中性 $\alpha$ -アミラーゼの場合 (30°C, 2.5時間処理) にはpH 5で既に酸による失活が始まり、pH 3.5で完全に失活した。

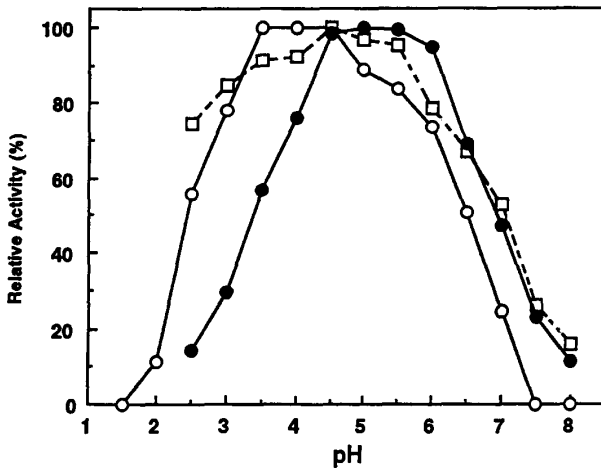


Fig. 4. pH-Dependency of the purified  $\alpha$ -amylase from citric acid-koji. The enzyme reactions were performed in 40mM acetate buffer, pH 4.0 at 37 °C (the purified enzyme,  $\circ$ ) and the crude enzyme,  $\square$ ) or pH 5.0 at 30 °C (the commercial enzyme,  $\bullet$ ). Soluble starch was used as a substrate. See text for details.

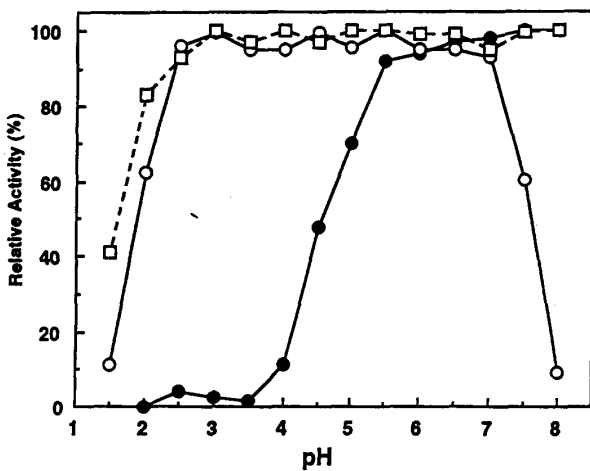


Fig. 5. pH-Stability of the purified  $\alpha$ -amylase from citric acid-koji. Enzymes were pre-incubated in each buffer (80mM McIlvaine, pH 1.5-8.0), for 5 hours at 37 °C (the crude enzyme and purified enzyme) or for 2.5 hours at 30 °C (the purified enzyme,  $\circ$ ) and crude enzyme,  $\square$ ) or pH 5.0, at 30 °C (the commercial enzyme,  $\bullet$ ).

一方、 $\alpha$ -アミラーゼ精製標品や麴粗酵素液のアミラーゼ活性は中性から pH 2.5 までほぼ完全に活性を保持していた。もし中性  $\alpha$ -アミラーゼが混在し

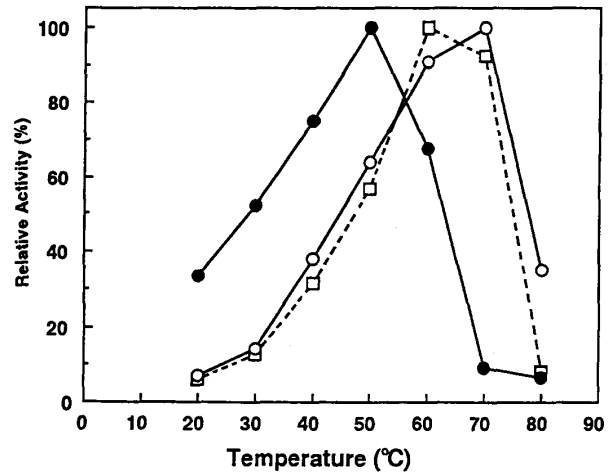


Fig. 6. Temperature-dependency of the purified  $\alpha$ -amylase from citric acid-koji. The enzyme reactions were performed in 40 mM acetate buffer, pH 4.0 (the purified enzyme,  $\circ$ ) and the crude enzyme,  $\square$ ) or pH 5.0 (the commercial enzyme,  $\bullet$ ).

ていれば、pH 5 以下で中性アミラーゼの失活に由来する活性の減少がみられるはずであるが、実際には観察されないで、この耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ標品には中性タイプが実質上混じっていないことが分かる。

### (3) 活性の温度依存性

興味深いことにこのクエン酸麴  $\alpha$ -アミラーゼと中性  $\alpha$ -アミラーゼとは pH に対する挙動だけではなく、反応温度に対しても異なった性質を示した。すなわち、中性  $\alpha$ -アミラーゼは 50 °C (pH 5.0) で最大活性を示したが、クエン酸麴  $\alpha$ -アミラーゼは 70 °C (pH 4.0) で最大になった (Fig. 6)。60 °C 以上では工業的プロセスで微生物の汚染がないとされているので、これは工業用酵素としての利用を考えたときには非常に好ましい性質である。なお、麴粗酵素液のアミラーゼ活性は 60 °C で最大活性を示し 70 °C でやや失活する傾向が認められた。これはグルコアミラーゼ活性の温度依存性を反映していると思われる。

## 考 察

鹿児島県では甘藷澱粉粕などを原料とし、黒麴である *A. niger* の変異株を用いる固体発酵によりクエン酸が年間約 9000 トン生産されている<sup>11)</sup>。このクエン酸麴の水抽出液は強い酸性 (pH 2.5) を示すにもかかわらず、その中には 1 g の麴当たり約 5 U のアミラーゼ活性が含まれることが分かった。可溶性

澱粉に作用させたときの生成糖に占めるグルコースの割合から判断して、グルコアミラーゼが約90%、 $\alpha$ -アミラーゼが約10%含まれると見積られた (Table 1). また、微弱ながら $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が見出されたが、セルラーゼ活性などは検出されなかった。

1トンのクエン酸麹当りに換算すると約 $5 \times 10^6$  Uのアミラーゼ活性があり、また、このアミラーゼ量は約30トン分の液化澱粉を糖化できる量である。クエン酸の年間生産量9000トンより算定すると、出麹酸度は平均18%なので、

$$9,000 / 0.18 = 50,000 \text{ トン}$$

の麹生産があったことになり、上記の数値と合わせると年間約 $2.5 \times 10^{11}$  Uのアミラーゼがクエン酸発酵の副産物として県内で生産されていたことになる。

このクエン酸麹抽出液から分離した $\alpha$ -アミラーゼ精製標品を用いて、通常のア. *oryzae* 起源の中性 $\alpha$ -アミラーゼの性質と比較した。この中性 $\alpha$ -アミラーゼは通常タカアミラーゼ A と呼ばれ、日本で最もよく研究されてきた酵素の一つである<sup>12,13</sup>。

まず pH に対する挙動であるが、このクエン酸麹 $\alpha$ -アミラーゼは中性 $\alpha$ -アミラーゼが完全に失活する pH 2.5でも失活せず、至適 pH も3.5~4.5の耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼであることが分かった。つぎに基質存在下での熱安定性について調べたところ、中性 $\alpha$ -アミラーゼではほぼ完全に熱失活してしまう70°Cで、クエン酸麹 $\alpha$ -アミラーゼは最大活性を示した。また、エバポレータによる減圧濃縮の過程で受ける熱にも失活しなかった。すなわち、クエン酸麹中の $\alpha$ -アミラーゼは工業用液化酵素として優れた熱安定性と耐酸性を合わせ持つことが分かった。最後に可溶性澱粉に対する作用様式を生成物のHPLC分析で調べたところ、オリゴ糖生成パターンで見ると、中性 $\alpha$ -アミラーゼとほとんど同じであった。しかし、予備実験ではマルトペンタオースに対しては異なる切断様式を示唆する結果が得られた (未発表データ)。

この耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼは酵素的諸性質からすると Minoda *et al.* の black *Aspergilli* の酵素<sup>3</sup>とおそらく同じと推定される。この酵素に関しては、ノボ社のグループからクローニングによる一次配列とX線回折による解像度2.1Åの立体構造を最近明らかにしている<sup>14</sup>。通常のア. *niger* の場合には、中性タイプの $\alpha$ -アミラーゼが多量に産生され、耐酸性タイプはむしろ非常にわずかしか産生されていない

<sup>15</sup>。一方、クエン酸麹の場合にはグルコアミラーゼから分離された $\alpha$ -アミラーゼは耐酸性タイプであった。中性タイプが産生されないのか、あるいは、培地が強い酸性のため中性タイプが産生されても失活しているのか、今後の検討課題のひとつである。

高崎らにより pH 4.5でも澱粉に作用する *B. licheniformis* の耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼが報告されている<sup>2</sup>が、本酵素はさらに耐酸性にすぐれ、高崎らの酵素がほぼ失活する pH 3.5~4.0でも至適 pH 範囲である。

最後にアミラーゼの回収システムについて考えてみる。上記のごとく、抽出液中には多量のグルコアミラーゼと少量の $\alpha$ -アミラーゼが含まれており、この $\alpha$ -アミラーゼは耐酸性と耐熱性に富み、工業用酵素として興味を持たれる。そして、この $\alpha$ -アミラーゼはグルコアミラーゼより培養初期に産生される傾向があり、固体培養2日では $\alpha$ -アミラーゼの活性の方が強い (未発表データ)。しかし、残念ながら現時点ではグルコアミラーゼと簡単に分離する方法を見つけれなかった。したがって、糖化用グルコアミラーゼ剤としてクエン酸麹中のアミラーゼを回収する方法を考えた。

前述のごとく固体培養6日後の出麹時のクエン酸麹抽出液中には約10%の $\alpha$ -アミラーゼが混在しているが、これは糖化用酵素剤として利用するときには欠点ではなく、むしろ分岐デキストリンや含燐デキストリンに対する分解性といった点では好都合な性質と思われる。

現在行われているクエン酸の回収法は発酵6日目の出麹を60~70°Cで約3時間の蒸気殺菌後、温水抽出 (~40°C) し、それを石灰で中和 (50→75°C) し

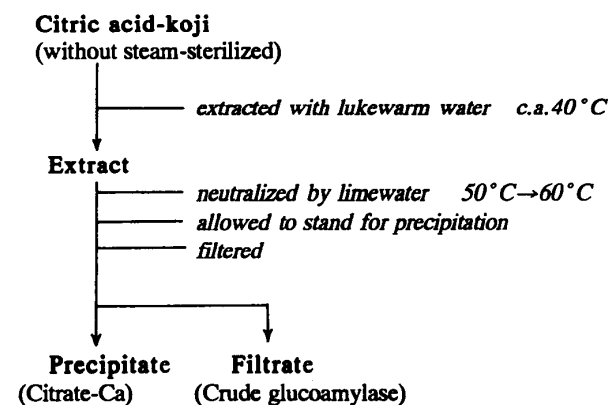


Fig. 7. Proposed scheme for co-recovery of citric acid and amylase from the citric acid-koji after 6 days in solid culture.

た後、沈澱するクエン酸石灰を熱時濾過・回収している。したがって、アミラーゼを同時に回収するためには熱でアミラーゼが失活しないような工程に変える必要がある。Fig. 7に我々が考えた同時回収法のスキームを示す。すなわち、最初の蒸気殺菌を省いたり、また中和・結晶化の工程で60℃以上の温度に長く曝さないようにする（現工程では中和熱で80℃近くになる）などの工夫を行なえば、既存の設備をほとんど変えなくても、中和廃液（濾液）から粗アミラーゼ液が回収できると考えられる。

### 要 約

クエン酸麴の水抽出液は強い酸性（pH 2.5）を示すにもかかわらず、その中にはかなりのアミラーゼ活性（約5 U/g 麴）が認められた。生成糖に占めるグルコースの割合からグルコアミラーゼが約90%、残り10%が $\alpha$ -アミラーゼであると見積られた。クエン酸抽出液よりカラムクロマトなどで精製した $\alpha$ -アミラーゼ標品の性質を、*A. oryzae*の中性 $\alpha$ -アミラーゼと比較して調べた。可溶性澱粉に作用させたときの生成物のアノマー分析をHPLCで直接行なったところ、この $\alpha$ -アミラーゼによる生成オリゴ糖はすべて $\alpha$ -アノマーであり、それらの生成物パターンも中性 $\alpha$ -アミラーゼとほぼ同じであった。また、この $\alpha$ -アミラーゼは中性 $\alpha$ -アミラーゼに比べて耐熱性に富んでいた。すなわち、至適pH範囲は3.5~4.5で、最大活性を70℃で示し、工業用液化酵素として優れた性質をもつ耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼであることが分かった。したがって、クエン酸製造工程（抽出、中和）において、アミラーゼの熱失活を防ぐ工夫をすれば、既存の設備のままでもクエン酸結晶母液から、同時にアミラーゼも取り出せる可能性が示唆された。

**謝辞** クエン酸麴 $\alpha$ -アミラーゼの貴重な精製標品を頂いた九州化工(株)犬塚孝治氏、麴サンプルを頂いたサツマ化工(株)の沖園清忠氏に感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Shetty, J. K. and Allen, W. G.: An acid-stable, thermostable  $\alpha$ -amylase for starch liquefaction. *Cereal Foods World*, **33**, 929-934 (1988)
- 2) Takasaki, Y., Furutani, S., Hayashi, S., and Imada, K.: Acid-stable and thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ . *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 94-96 (1994)
- 3) Minoda, Y. and Yamada, K.: Acid-stable  $\alpha$ -amylase of black *Aspergilli*. Part I. *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 806-811 (1963)
- 4) 川原一・松田大典・松久保好太朗：クエン酸麴のアミラーゼについて、鹿児島県工試報告, **35**, 32 (1960)
- 5) Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380 (1944)
- 6) 井川幸雄・小原侃：ブドウ糖酸化酵素—カタラーゼ系利用による血糖測定法, 臨床病理, **13**, 197-201 (1965)
- 7) 岩野君夫・風間敬夫・布川弥太郎：清酒醸造に関連する諸酵素の研究 (第1報). 醸協誌, **71**, 383-386 (1976)
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 9) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956)
- 10) 木村淳夫・千葉誠哉：HPLCによるオリゴ糖のアノマー分析・澱粉科学, **36**, 237 (1989)
- 11) 沖園清忠・松久保好太朗：甘藷利用工業廃棄物の処理と利用について, 澱粉と食品, **19**, 55-58 (1994)
- 12) 大西正健・菅沼俊彦：タカアミラーゼA, アミラーゼ—生物学へのアプローチ, 中村道徳監修. p.249-299, 学会出版センター, 東京 (1986)
- 13) Sugauma, T., Matsuno, R., Ohnishi, M., and Hiromi, K.: A study of the mechanism of action Taka-amylase A on linear oligosaccharides by product analysis and computer simulation. *J. Biochem.*, **84**, 293-316 (1978)
- 14) Boel, E., Brady, L., Brzozowsky, A. M., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Jensen, V. J., Petersen, S. B., Swift, H., Thim, L., and Woldike, H. F.: Calcium Binding in  $\alpha$ -Amylase: An X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry*, **29**, 6244-6249 (1990)
- 15) Minoda, Y., Arai, M., Torigoe, Y., and Yamada, K.: Acid-stable  $\alpha$ -amylase of black *Aspergilli*. Part III. *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 110-113 (1968)

### Summary

Glucoamylase and acid-stable  $\alpha$  - amylase were found in the acidic extract (pH2.5) of koji for citric acid production after 6 days in solid culture of a variety of *Aspergillus niger*. The ratio of glucoamylase and  $\alpha$  - amylase was estimated to be about 90:10, judging from productions of glucose and the reducing sugar determined by both the glucose-oxidase and Somogyi-Nelson methods, when soluble starch was digested at pH4.0.

Using a partially purified  $\alpha$  - amylase (10.6U/mg) from the citric acid-koji, its enzymic properties were compared with those of the neutral  $\alpha$  - amylase from *A. oryzae*. HPLC analysis showed that the oligosaccharides were produced in their  $\alpha$  - anomers on the enzymic digestion of soluble starch and its product pattern was very similar to that of the neutral  $\alpha$  - amylase. It may be noted that the  $\alpha$  - amylase is excellent for industrial use, since the enzyme is more acid-stable and more thermostable than the neutral  $\alpha$  - amylase. The enzyme exerts its maximum activity at pH 3.5 ~ 4.5 and about 70 °C.

With a slight modification of the manufacture processes, we could recover the amylases from the koji, as one of the by-products of citric acid-production. Hence procedure for co-recovery of citric acid and amylases was proposed.