

糖化アミラーゼに関する研究 (第1報)

Endomyces 属の生産する amylase の分離と精製

萬 雄 治*・原 田 芳 祐**・中 浜 敏 雄*

YUJI MAN, YOSHISUKE HARADA and TOSHIO NAKAHAMA : Studies on
saccharogenic amylase (I)

Separation and purification of amylase produced by *Endomyces*

摘 要 *Endomyces* 及び *Endomycopsis* について amylase 生産菌の検索を行ない、振盪培養によつてよく amylase を生産する菌数株を得た。そのうち特に amylase 生産能の大きい *Endomyces lindneri* -3 (N) 1008 について培養条件の検討、酵素の分離精製、及び精製酵素の性質を検討した。

本菌による amylase 生産は麩を懸濁状態にした液体培地を用い、30° 4 日間の振盪培養が適当である。培養液より硫酸塩析、リバノール処理、アセトン分別等により精製酵素を得た。

本酵素は糖化型 amylase 及び α amylase の両作用を有している。糖化作用の最適 pH は 5.2~5.8 である。pH 4.5~7.5, 50° 以下において安定である。Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ により酵素活性は賦活されるが、Ag⁺, Hg⁺⁺, Cu⁺⁺ により著しく活性は阻害されることを認めた。

可溶性澱粉の分解限度はほぼ 100% に達し、各種生澱粉に対する分解率は澱粉の種類によつて異なるが、馬鈴薯澱粉はほぼ 100% 分解することを認めた。

緒 論

糸状菌の糖化型 amylase¹⁾²⁾ が結晶ブドウ糖の製造に工業的に利用されるに至り、その酵素生産において固体培養を行なう必要がある関係から、原料当りの収量の少ないこと、労働力、工場面積が多く必要であること等、未解決の問題がある。これらの問題の解決の一方法として液内培養による酵素生産が考えられ、これを可能ならしめる酵素資源の探求が一つの大問題となつてきた。

酵母の一種である *Endomycopsis fibuliger* を麩等を用いた固体培養、又は液内通気培養を行なうと菌体外に amylase を生産することが、WICKERHAM³⁾ 等によつて見出されている。さらにこの種の菌の生産する糖化型 amylase についても、二三の報告⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾ がある。

著者等は *Endomyces* 属及び *Endomycopsis* 属の amylase 生産菌の検索を行ない、そのうちの糖化型 amylase 生産能の大きい *Endomyces lindneri* -3(N) 1008 の amylase について検討を行なつた。

実 験 の 部

1. amylase 生産菌の検索

a) 培養基組成

培地 A	麩	2g
	馬鈴薯澱粉	1g
	水	100ml
培地 B	可溶性澱粉	1g
	酵母エキス	0.5g
	水	100ml

b) 培養条件

上記培養基を 500 ml 容の振盪フラスコに 100 ml 宛入れ、滅菌後菌株を一白金耳ずつ接種し、30° 65 時間振盪培養を行なつた。なお振盪数は、100 oscills/min であつた。

c) 酵素力価の測定

糖化力 (S 力) : 1% 可溶性澱粉 5 ml. 1/20 M 醋酸緩衝液 (pH 5.0) 4 ml. 酵素液 1 ml より成る反応液を 40° 30 分間反応させ、生成還元糖を Felling Lehman School 法にて glucose として定量し、10mg の glucose を生じる酵素力を 1 単位とした。

糊精化力 (L 力) : 糖化力測定と同一組成の反応液を 40° にて反応させ、経時的にその 0.5 ml を $\frac{N}{1000}$ 沃度溶液 0.5 ml に添加し、その呈色が赤変するまで

* 京都府立大学農学部応用菌学研究室

** 日本丸天醤油株式会社

第1表 *Endomyces* 及び *Endomycopsis* の培養液の糖化力の比較

菌 株	糖化力 (S) u/ml	
	培地 A	培地 B
<i>Endomyces hordei</i> Saito (N) 1003	2.63	2.66
" <i>hordei</i> -I Saito (N) 1004	1.36	1.18
" <i>hordei</i> -D (N) 1009	2.03	2.75
" <i>hordei</i> -E (N) 1010	1.06	2.06
" <i>lindneri</i> Saito (N) 1007	1.12	2.09
" <i>lindneri</i> -3 Saito (N) 1008	9.64	7.85
" <i>magnusii</i> HUT 7075	0.98	0.22
" " HUT 7076	0.88	6.06
" " HUT 7077	0.09	0.14
" " HUT 7215	0.64	0.76
" " HUT 7237	0.55	1.30
" <i>vernalís</i>	0.00	0.36
<i>Endomycopsis fibuliger</i> HUT 7206	5.73	4.93
" " Y-25	1.00	7.42
" " Y-1062	2.59	2.08
" <i>hordei</i> Saito (N) 1005	4.50	5.59
" " HUT 7209	5.02	3.07
" <i>lindneri</i> HUT 7210	0.85	2.37
" <i>Capsularis</i>	0.58	0.00

第2表 培 養 基 の 検 討

(数値は水 100 ml に対する g 数)

No.	soluble starch	麩	glucose	dextrin	peptone	yeast ext.	硫酸	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	CaCO ₃	糖化力 u/ml
1	2								0.1	0.05	0.5	4.38
2	2					0.5			0.1	0.05	0.5	4.78
3	2				0.1		0.5		0.1	0.05	0.5	5.30
4	2					0.1	0.5		0.1	0.05	0.5	5.51
5				2			0.5		0.1	0.05	0.5	5.68
6				2	0.1		0.5		0.1	0.05	0.5	4.51
7	2		2				0.5					5.69
8	2		2		0.1							4.54
9	2		2		0.1			0.5				9.63
10	2	5										6.90
11	2	5				1						6.86
12	2	5					0.5					7.84
13	2	5						0.5				14.86
14		5		2								12.67
15		5		2			0.5					6.84

の時間を測定する。この条件で10分間で沃度反応を赤変させる酵素力を1単位とした。

d) 実験結果

19株の *Endomyces* 及び *Endomycopsis* を培養後濾過し、その培養濾液の糖化力を比較した結果を第1表に示す。

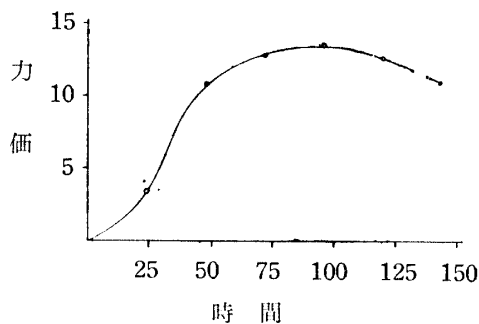
19株の試験菌中比較的 amylase 生産の多いものは

Endomyces lindneri-3 (N) 1008. *Endomycopsis fibuliger* (N) 7206. *Endomycopsis fibuliger* Y-25. *Endomycopsis hordei* (N) 1005. *Endomycopsis hordei* (N) 7209, であつたが、2種の培地においても共によく amylase を生産する *Endomyces lindneri*-3 (N) 1008 について以下の検討を行なつた。

2. 培養条件の検討

第3表 酵 素 の 精 製

	全 容 ml	糖化力 (S)		糊精化力 (L)		S/L
		全活性 u	比活性 u/mg-N	全活性 u	比活性 u/mg-N	
培養濾液 (F ₁)	1890	11870	18.36	12590	19.47	0.94
↓ 硫酸塩析 (0.2~0.8飽和) 沈 澱 M/15 phosphate buffer (pH6.0) に溶解, 流水透 析 2 日						
透析内液 (F ₂)	560	6600	53.44	8016	54.37	0.98
↓ リバノール添加 (0.05%) 沈 澱 M phosphate buffer (pH 6.0) に溶解・抽出, 酸性 白土を添加濾過						
濾 液						
↓ 蒸留水透析 0°, 1日						
透析内液 (F ₃)	400	5460	203.73	5700	212.73	0.96
↓ acetone 添加 (38~55%) 沈 澱 M/20 acetate buffer (pH 5.6) に溶解						
精製酵素液 (F ₄)	100	3110	464.77	3230	482.08	0.96



第1図 培養経過

a) 培養基の選択

Endomyces lindneri-3 (N) 1003 の糖化 amylase 生産に最適なる培養基を選択するため、第2表に示す如き培地を用い、上記の条件で72時間振盪培養を行ない、その培養濾液について糖化力を測定した。

この結果、硫酸、dextrin、Na₂HPO₄、麩は amylase 生産に効果が認められた。ことに麩を培地中に懸濁させて使用することは、培地調整時における抽出、濾過の操作を省略し得る点、実用的見地からも興味があるものと考えられる。

以後、本実験においては次の組成を有する培地を基本培地とした。

基本培地	麩	5g
	可溶性澱粉	2g
	Na ₂ HPO ₄	0.5g
	水	100ml
	pH	6.6~7.0

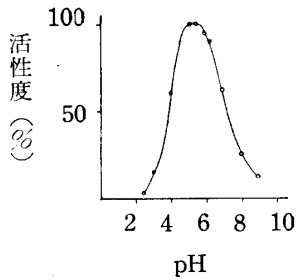
b) 培養時間の検討

基本培地を用い、前記条件で培養し、経時的に糖化力を測定した。第1図に示す如く、糖化力は、菌の発育に伴って増加するが、100 時間程度で最高に達し、以後やや減少する。従つて4日間培養が適当であろうと考えられる。

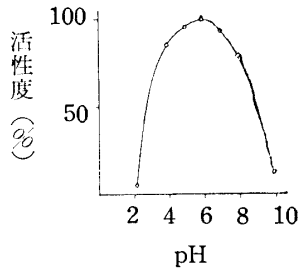
3. 酵素の精製

Endomyces lindneri-3 (N) 1003を基本培地に30°, 96 時間振盪培養を行ない、その培養濾液を用いて、第3表に示す如く酵素の精製を行なつた。本菌は糖化 amylase と共に α amylase を生産するものと考えられ、培養濾液において S/L 比 (糊精化力に対する糖化力の比率) 0.94 を示す。

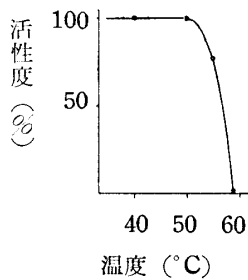
培養濾液を硫酸塩析すると 0.8 飽和まで amylase は沈澱する。沈澱を少量の M/20 phosphate buffer (pH6.0) に溶解し、流水中に2日間透析を行なつたのち、リバノールを加えて生ずる沈澱を集め、M phosphate buffer (pH6.0) に溶解、一昼夜抽出後濾過、酸性白土によりリバノールを除去し、氷室中において蒸留水に対し1日透析した。透析後 acetone 分別により約 26% の収率で精製酵素を得たが S/L 比はほとんど変化せず、従つて本菌の分泌する amylase は糖化型酵素と液化型酵素とが極めて類似した性質をもつために分別出来なかつたとも考えられ、又一方、福本、辻阪⁹⁾の説による α 型 amylase に属する糖



第2図 pH 活性度



第3図 pH 安定性



第4図 耐熱性

化 amylase であつて単一なものとも考えられたがこの点については今後詳細な検討に待つべきであろう。

4. 精製酵素の諸性質

a) pH 活性度

糖化力測定と同様の方法で、緩衝液の pH のみを種々変化させ、(pH2.2~8.0 : M/10 McIlvaine buffer, pH8.0~10.0 : M/10 Kolthoff buffer) pH と活性度との関係を調べた。第2図に示す如く、最適 pH は 5.2~5.8 であることが明らかとなつた。

b) pH 安定性

酵素液 1 ml に各種 pH の緩衝液 (pH 活性度測定と同様) 2 ml を加え 24 時間、0° に放置後 M/2 acetate buffer (pH 5.6) により、全容を 5 ml とし糖化力を測定した。その結果第3図に示す如く、pH 4.5~7.5 では 90% 以上の活性を保つが、それ以上の pH の増加・減少と共に急激に失活することを認めた。従つて本酵素は pH 4.5~7.5 の範囲で安定であると考えられる。

c) 耐熱性

酵素液を各種温度に15分間処理した後急冷し、酵素活性を測定した。その結果第4図に示す如く 50° までは安定であるが、それ以上の温度では急激に失活し、60° ではほとんど完全に失活することを認めた。

d) 金属イオンの影響

酵素液 1 ml に各種金属イオン液 1 ml を添加し、0°, 12 時間放置後酵素活性を測定した。その結果は第4表に示す如くであり、本酵素は Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ により賦活され、Ag⁺, Hg⁺⁺, Cu⁺⁺ の如き重金属イオンにより著しく活性を阻害されることが明らかとなつた。

第4表 金属イオンの影響

イオン	イオン濃度 (M)	活性度
Ca ⁺⁺	0.01	175
Mg ⁺⁺	0.001	146
Al ⁺⁺⁺	0.001	90
Co ⁺⁺	0.001	95
Ni ⁺⁺	0.001	95
Mn ⁺⁺	0.001	95
Fe ⁺⁺⁺	0.001	95
Pb ⁺⁺	0.001	95
Ag ⁺	0.001	15
Hg ⁺⁺	0.001	0
Cu ⁺⁺	0.001	15

5. 精製酵素による澱粉分解

a) 可溶性澱粉の分解率

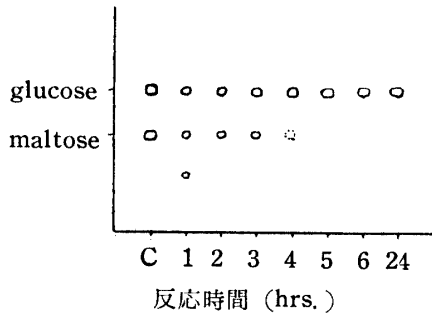
本酵素の澱粉分解限度及び機作を調べるため、次に示す組成で 40° において反応させ、経時的に生成 glucose 量を測定すると同時に (B) 組成の反応生成物を paper chromatography にて確かめた。

反応組成

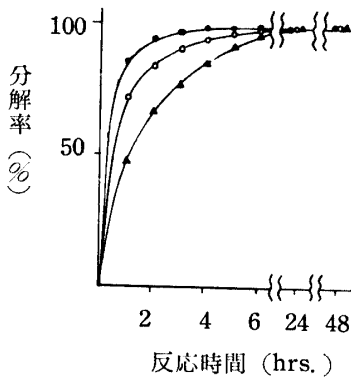
	(A)	(B)	(C)
1%可溶性澱粉	5 ml	5 ml	5 ml
M/2 acetate buffer (pH5.6)	4 ml	3 ml	2 ml
enzyme solution	1 ml	2 ml	3 ml

第5図に示す如く3時間後においては maltose の存在を認めるが、6時間後には既に glucose のみを検出し、以後他の生成物を認めず、完全に glucose に分解したものと考えられる。

一方第6図に示す分解限度曲線においても、6時間後にはほとんど 100% 近く分解することを認めた。又この程度の酵素量の差は分解速度に差を生ずるが分解限度には関係しないことを認めた。



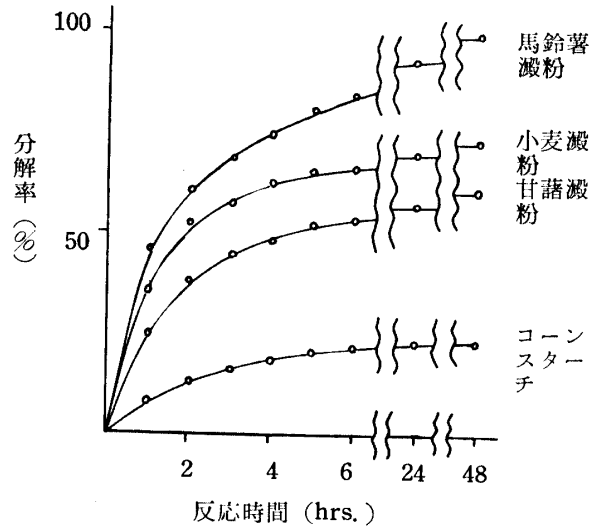
第5図 澱粉分解生成糖の paperchromatogram
 展開剤：buthanol：pyridine：水(4:3:1)
 発色剤：アニリンフタル酸塩



第6図 可溶性澱粉分解率
 —▲—▲— : (A)
 —○—○— : (B)
 —●—●— : (C)

b) 各種生澱粉の分解率

各種生澱粉の1%溶液5mlにM/20 acetate buffer 4ml, 酵素液1mlを加え40°で反応させ経時的に生成 glucose を測定した, その結果, 第7図に示す分解曲線の如く, 澱粉の種類によつて糖化に難易が



第7図 生澱粉分解率

あり, 馬鈴薯澱粉はほとんど100%分解するにもかかわらず, 甘藷澱粉, 小麦澱粉は60~70%, コーンスターチは約20%しか分解しないことを認めた.

文 献

- 1) 福本, 辻阪: 科学と工業, 28, 92 (1954)
- 2) 辻阪, 福本, 山本: Nature, 181, 94 (1958)
- 3) WICKERHAM, L. J., LOCKWOOD, L. B., PETTIJOHN, O. G. and WARD, G. E.: J. Bact., 48, 413 (1944)
- 4) 福本, 辻阪, 荒木: 科学と工業, 34, 423(1960)
- 5) 服部, 竹内: 理化学研究所報告, 37, 37 (1961)
- 6) 服部, 竹内: Agr. Biol. Chem., 25, 737(1961)
- 7) 服部, 竹内: Agr. Biol. Chem., 25, 895(1961)
- 8) 福本, 辻阪, 岩井, 荒木: 日本農芸化学会大会シンポジウム講演, 4月3日 (1961)

Summary

From several strains of *Endomyces* and *Endomycopsis* we have found a strain, *Endomyces lindneri*-3 (N) 1003, to which produced a high saccharifying amylase in shaking culture. The production of the enzyme was most effective in liquid medium containing wheat bran. By means of salting out, decolorization with rivanol and acetone precipitation, a highly amyloglucosidase preparation has been obtained from a shaken

culture broth. The properties of this enzyme had optimum pH in 5.2 ~ 5.8 and was stable in pH 4.5 ~ 7.5 and 0 ~ 50°C. This enzyme was activated by Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺, but inactivated by Ag⁺, Hg⁺⁺ and Cu⁺⁺. This enzyme was shown nearly 100% in hydrolysis degree of soluble starch and the differential degree of hydrolysis on the native starch.