

氏 名 (本籍)	わた 渡	なべ 部	かず 一	ほ 穂 (秋田県)
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農	第	23	号
学位授与年月日	昭和42年 6月 8日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
最終学歴	昭和33年 3月 東北大学農学部卒業			
学位論文題目	STUDIES ON SACCHAROGENIC AMYLASE SYSTEM PRODUCED BY ASPERGILLUS AWAMORI (アワモリ系麹菌の生産する糖化型アミ ラーゼ系に関する研究)			
論文審査委員	(主 査) 教授	玉利勤治郎	教授	高橋 甫 志村 憲助

論文内容要旨

要 旨

現在アルコール製造用液体麴に使用されている *Aspergillus awamori* var. *fumeus* - 1 菌に Co-60 の γ 線を照射してえられた人工変異菌株 *Aspergillus awamori* var. *fumeus* - 1 - B42 は親株より糖化型アミラーゼ生産力が強く、液化型アミラーゼ生産力が弱い特長をもっている。著者は本菌のこの特長に着目し、当時盛んにおこなわれていたデンプン糖の製造、あるいはその他の目的に使用するため、まず本菌の培養条件、生産された糖化型アミラーゼの性質などについて検討した。その結果本菌の糖化型アミラーゼ系には pH2.5、30°C の酸処理で失活するものと失活しないものの二種類が存在する可能性が強く考えられた。そこでまず、二種類の糖化型アミラーゼの存在を以後に述べるように確認し、次いでこれら二種類の糖化型アミラーゼを精製し、その種々の性質を明らかにし、両者の差異を検討した。その結果、これら両糖化型アミラーゼはそれぞれ別種のたん白質より成ること、および酸に弱い糖化型アミラーゼが黒麹菌アミラーゼ系に存在する新事実を見出した。以下えられた個々の結果を要約して述べる。

1. 二型糖化型アミラーゼの存在の確認

本菌を糖化型アミラーゼ生産のための最適 pH (4.5 ~ 5.0) で培養してえられる糖化型アミラーゼ系を pH2.5、30°C で酸処理すると、1 hr 以内で約 40% の活性が失活し、残る 60% の活性は以後 24hr、以上の同処理によつても失活しない。この事実は本菌糖化型アミラーゼ系は pH2.5、30°C で失活する糖化型アミラーゼと、失活しない糖化型アミラーゼの二種類から成る可能性を示す。以下これら二種類の分画を試み、その存在を確認した。

培養 pH を変えることにより、生成する酵素組成が異なることはすでに知られ

ているので、この方法による二種類の分画を試みた。その結果、培養 pH 2.0、～2.5 で生成する糖化型アミラーゼは上記酸処理によつて失活しないが、培養 pH 6.0～6.5 で生成する糖化型アミラーゼは 1 hr. 以内でほとんど失活すること、および培養 pH 4.5～5.0 で生成する糖化型アミラーゼの pH 安定性は培養 pH 2.0～2.5 および 6.0～6.5 で生成する糖化型アミラーゼの pH 安定性の中間の性質を示すことが明らかになつた。この事実は培養 pH 4.5～5.0 で生成する糖化型アミラーゼ系は培養 pH 2.0～2.5 および 6.0～6.5 で生成する糖化型アミラーゼの混合物であることを示す。

培養 pH 4.5～5.0 で生成する糖化型アミラーゼ系の DEAE-cellulose chromatography をおこなうと、pH 8.0～7.0 および pH 5.1～3.9 で溶出する二区分に分画された。前者は上記酸処理によつて 1 hr. 以内にほとんど失活し、後者は失活しない。また培養 pH 2.0～2.5 で生成する糖化型アミラーゼについて同様な chromatography をおこなうと pH 5.1～3.9 で溶出する区分のみであつた。培養 pH 6.0～6.5 のものはほとんどが pH 8.0～7.0 で溶出する区分であつた。

以上の結果から本菌糖化型アミラーゼ系は酸に対する耐性の異つた二種類から成ることが確認された。著者はこれら二種類の糖化型アミラーゼを、耐酸性糖化型アミラーゼ (acid-stable saccharogenic amylase) および弱耐酸性糖化型アミラーゼ (less acid-stable saccharogenic amylase) と呼んで区別した。

2. 二型糖化型アミラーゼの精製と性質

耐酸性、弱耐酸性糖化型アミラーゼの種々の差異について検討するため、これらを精製した。

耐酸性糖化型アミラーゼは酸性白土処理 (5%、pH 4.5～5.0)、アセトン沈でん (35～55%)、硫酸塩析 (45～75%飽和)、リバノール沈でん、DEAE-cellulose chromatography (溶出 pH 5.4～4.0 区分)、DEAE-

cellulose chromatography (0.05 M リン酸緩衝液、pH 7.0、KCl 0.19 ~ 0.24 M 区分)、アセトン沈でん(40~50%)によつて精製した。

弱耐酸性糖化型アミラーゼは酸性白土処理(5%、pH 5.0)、アセトン沈でん(40~60%)、硫酸塩析(50~75%飽和)、リパノール沈でん、DEAE-cellulose chromatography (溶出 pH 8.0~7.0 区分)、酸処理 (pH 3.5、10°C、24 hr.)、アセトン沈でん(45~55%)、酢酸セルロース電気泳動、DEAE-cellulose chromatography (0.02 M リン酸緩衝液、pH 7.4、KCl 0.18~0.22 M 区分)によつて精製した。

両精製標品はいずれも超遠心沈降法、チゼリウスの電気泳動法により均一性が証明された。

両糖化型アミラーゼの pH 活性曲線を比較すると、耐酸性糖化型アミラーゼが弱耐酸性糖化型アミラーゼより酸性側に傾いていた。最適作用 pH は耐酸性糖化型アミラーゼが 4.5~4.6、弱耐酸性糖化型アミラーゼは 4.8 であつた。安定 pH 範囲は耐酸性糖化型アミラーゼが 2.4~7.5、弱耐酸性糖化型アミラーゼが 3.9~8.2 とかなりの差があつた。熱安定性においても耐酸性糖化型アミラーゼが弱耐酸性糖化型アミラーゼより若干優れていた。

3. 二型糖化型アミラーゼの不活性化および阻害

両糖化型アミラーゼの種々の化合物による不活性化および阻害の度合はかなり異つていた。即ち、耐酸性糖化型アミラーゼは Hg^{++} 塩によつて不活性化されないが、弱耐酸性糖化型アミラーゼは強く不活性化される。 Cu^{++} 塩、 Ag^{++} 塩、 UO_2^{++} 塩、硫化ナトリウム、pH 3.0 での酸性染料による不活性化は弱耐酸性糖化型アミラーゼの方が大きく、一方、過マンガン酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウムによる不活性化および δ -グルコノラクトンによる阻害は耐酸性糖化型アミラーゼの方が大きい。

また、プロテアーゼによる不活性化はプロテアーゼの種類によつてかなり異つていた。即ち、耐酸性糖化型アミラーゼはプロナーゼ(放線菌プロテアーゼ)

によつて強く、パパインによつてもかなり不活性化され、ペブシンによつては不活性化されない。一方弱耐酸性糖化型アミラーゼはペブシンによつて強く、プロナーゼで若干不活性化されるが、パパインによつては不活性化されない。

以上の結果から、両糖化型アミラーゼを構成するたん白質は異つていると結論される。異つたたん白質から成る二種類以上の糖化型アミラーゼが一菌株から生産される事実は現在まで知られていなかつた。また、林田が報告しているような、何らかの修飾を受けた類縁的酵素ではなく、全く別種のたん白質より成る別種の酵素であるという結論から考えると、これら二種類のうちの弱耐酸性糖化アミラーゼは黒麹菌アミラーゼ系では知られていない新しい型の糖化型アミラーゼである。

4. 二型糖化型アミラーゼの各種基質に対する作用

各種でんぷんに対して、耐酸性糖化型アミラーゼは90%以上の高い分解率を示すが、弱耐酸性糖化型アミラーゼは80%以下の分解率しか示さない。この点において両糖化型アミラーゼは大きく異つている。即ち耐酸性糖化型アミラーゼはいわゆる *Rhizopus* 型に、弱耐酸性糖化型アミラーゼは *Asp. niger* 型に属する。直鎖基質に対しては両酵素共に100%の分解率を示すが、分枝基質に対しては、でん粉の場合と同様その分解率には差がある。

グルコ二糖類に対して、両酵素共に α -結合の Kojibiose、Nigerose、Maltose、Isomaltose を分解すると共に、 β -結合の β 、 β -Trehalose をも分解できる。 α -glucosidase のはんちゆうに入る糖化型アミラーゼが α 、 α -Trehalose を分解しないで、 β 、 β -Trehalose を分解する事実は非常に興味深い。現在 β 、 β -Trehalose 分解力をもつ糖化型アミラーゼはほかに知られていない。

両糖化型アミラーゼの示す β 、 β -Trehalose 分解力はほかの酵素の混在による可能性が考えられる。 β -glucosidase によるものではないことは、ほかの β -結合のグルコ二糖類を分解しないことから明らかであるが、これ以外に β 、 β -Trehalose 様酵素（現在その存在は確認されていない）の混

在も考えられる。しかし両糖化型アミラーゼ標品中の糖化型アミラーゼ活性と β 、 β - Trehalose 分解活性は、各種 pH 処理、熱処理、不活性化剤によつてもその失活の挙動がほとんど同じであることから、他の酵素の混在によるものではなく、本糖化型アミラーゼ類それ自身もつている性質であることが認められた。

審査結果の要旨

論文提出者は現在アルコール製造用液体麹に使用されている *Aspergillus awamori* var. *fumeus* 1 に Co-60 の γ 線を照射して得られた変異株 1-24 号菌は親株より糖化型アミラーゼ生産力が強く、液化型アミラーゼ生産力が弱い特長をもっている点に着目してこれを澱粉糖の製造その他の目的に利用せんとしてその糖化型アミラーゼに関する研究を行った。研究の結果は全菌の産生する糖化型アミラーゼ系は耐酸性の異なる 2 種類、即ち耐酸性及び弱耐酸性糖化型アミラーゼより成ることが明らかにされた。精製に苦心を重ねた末両糖化型アミラーゼはいずれも均一な酵素蛋白として分離された。そして両者は蛋白変性剤、阻害剤或いは各種蛋白分解酵素による失活の挙動から見て類縁的な酵素ではなく、全く別種の蛋白質より成る酵素であることを認めた。一菌株が耐酸性を異にする 2 種類以上の糖化型アミラーゼを産生する事実は未だ知られていない。また耐酸性の弱い糖化型アミラーゼは今迄黒麹菌では知られていないのであって、これは新しい型の糖化型アミラーゼであると言える。なおまたこれら 2 種類の糖化型アミラーゼは $\beta \cdot \beta$ -Trehalose を加水分解すると言う今迄の糖化型アミラーゼでは見られなかった基質特異性をもっている。

以上の如く本論文は糖化型アミラーゼに関して全く新しい知見を提供したものであって、学術上寄与する所大なるものがあると考えられ、審査員一同は本論文に対して農学博士の学位を授与するに値すると認定した。