

(278) (坂本, 守随) 微生物の生産する酵素並びに其の利用に関する研究 (第7報)

微生物の生産する酵素並びに其の利用に関する研究 (第7報)

蜘蛛巣黴属菌プロテアーゼ, アミラーゼの性質に就いて

坂本 政 義・守 随 稀 雪 (KK科学研究所)

緒 言

CORMAN¹⁾は Starch から直接 Glucose を生成する絲状菌 Amylase を Glucogenic enzyme として論及したが、次で PHILLIPS²⁾は *Rh. delemar* から分離した所謂 Gluc. amylase は耐酸性あり Starch から Glucose を生成し併せて Maltase 力を示すが Isomaltase 力を示さない性質から麹菌 Amylase と類似する事、福本氏³⁾は更に Gluc. amylase は糖化、液化を司る別個の活性中心をもち其の結晶には単結晶と 酸変性失活の二次的結晶の二つある事、一方岡崎氏⁴⁾は Starch 分解作用機作から *Rhizopus* を *Rh. tonkinensis*, *Rh. peka* の2型に分類し複合酵素系の作用を明らかにした上其の相違は α -amylase, S-amylase, Maltose-transglucosidase 三者の Mixed ratio の差に關聯する事を究明した。尚 *Rhizopus* amylase に就ては貴重な多数の報告があるが之に反して Protease に就ては前報に述べた如く全く見るべきものがない。そこで本報では *Rhizopus* enzyme の応用見地から Protease, Amylase の基礎的事項に就いて検討した二、三の結果を報告する。

実 験 の 部

I. 実験方法

1. 供試菌株

Rh. tonkinensis R6-4, *Rh. peka* IR2-4, *Rh. javanicus* HATSUKEN No. 3 の3株に就いて試験した。

2. Amylase, Protease 作用pH

1) 酵素液 *Rhizopus* 麴麴, 米麴:緩衝液=1:10抽出液を酵素原液とした。

2) 基質 蛋白基質として Milk Casein, Soybean casein, Hemoglobin 澱粉基質として Soluble starch を使用した。

3) Amylase 測定法 α -amylase は WOHLGEMUTH 法に依る分数, S-amylase は BERTRAND 法に依る還元糖の生成量で表示した。

4) Protease 測定法 Casein, Hemoglobin の場合 ANSON の比色法, Gelatin の場合 Formol titration 法に依つた。

4.0% Gelatin 15cc, MCILVAINE buffer soln. 10cc, Enzyme soln. 5.0cc, Toluol 2.0cc調製液を共栓試験管に採取し, 40°C, 24hr消化後 N/10 NaOH にて滴定した容量cc数 (Control との差) で表示した。

3. Amylase, Protease 作用経時曲線

1) 糖化曲線 4.0% Soluble starch 50cc, MCILVAINE buffer soln. 40cc, Enzyme soln. 10cc, Toluol 2 ccの配合にて40°C, 8hr消化其の間経時的に2.0cc採取其の糖量(mg)と時間との関係を図示した。

2) 蛋白消化曲線 10% Gelatin 75cc, MCILVAINE buffer soln. 45cc, Enzyme soln. 20cc, pH=6.5 規制後 Toluol 5.0cc添加し共栓フラスコ内にて38°C, 24hr消化此の間経時的にアミノ酸生成量を測定し時間との関係を図示した。

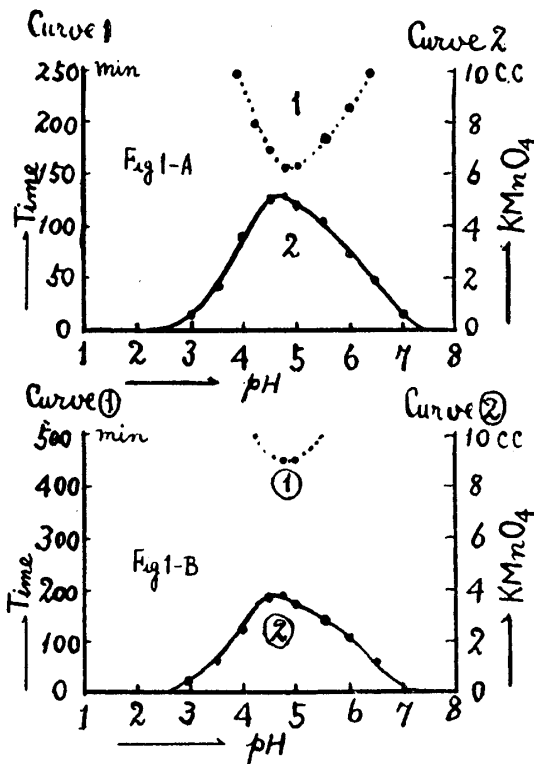
3) Defatted soybean 消化曲線

Defatted soybean powder (T.S. 13.4%, T.N. 9.1%) 6.0g, MCILVAINE buffer soln. 190cc, Enzyme soln. 10 cc, pH=5.5 規制後 Toluol 10cc 添加し共栓フラスコ内にて38°C, 24hr消化此の間経時的に TCA soluble N, アミノ酸, 全糖, 直糖を測定し時間との関係を図示した。

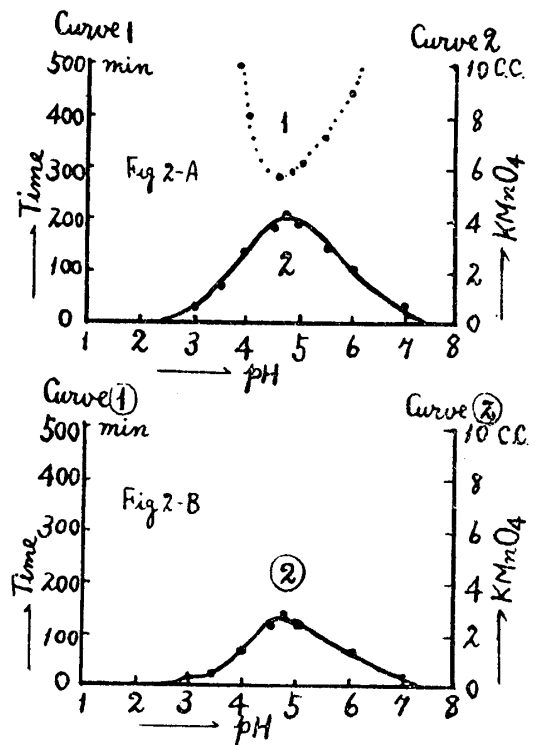
II. 実験結果

1. Amylase, Protease 作用pH曲線

1) Amylase 作用とpHとの関係 Fig.1-A, 2-A は *Rh. tonkinensis*, *Rh. peka* の無処理 α -amylase, S-amylase のpH曲線, Fig.1-B, 2-B は其の Amylase を pH=3.0, 40°C, 10min 条件処理した後の pH 曲線である。此の曲線に見られる如く *Rh. tonkinensis*, *Rh. peka* の α -amylase, S-amylase 作用の Opt. pH=4.5~5.0 範囲で pH=4.7 に Peak を示した。且 *Rh. tonkinensis* の α -amylase を WOHLGEMUTH 法に依り測定した分数は pH=

Fig. 1. *Rh. tonkinensis* の Amylase 作用力と pH との関係曲線

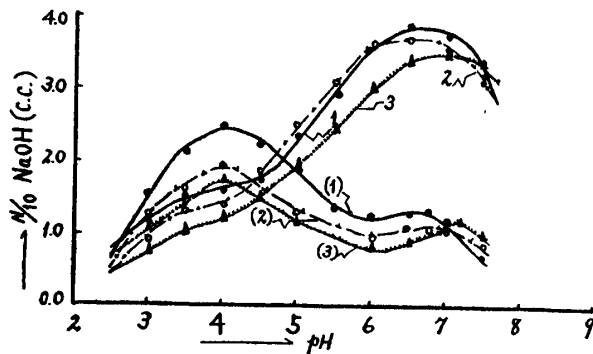
- 1 無処理 α -amylase
① 処理 α -amylase

Fig. 2. *Rh. peka* の Amylase 作用力と pH との関係曲線

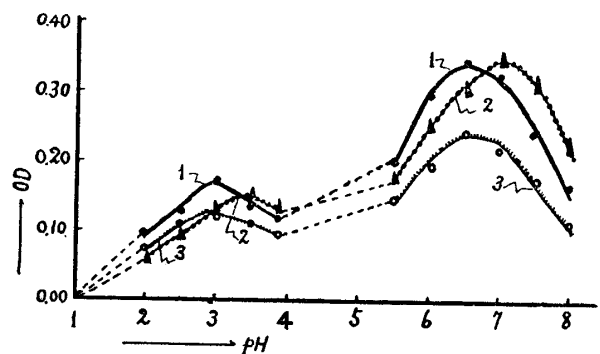
- 2 無処理 S-amylase
② 処理 S-amylase

4.7 の時無処理酵素液では 155min, 処理酵素液では 450min, *Rh. peka* に於ては 300min, >500min であり, 何れも α -amylase は弱いが特に *Rh. peka* の場合 pH=3.0 短時間処理に依る失活度は大であつた. S-amylase は *Rh. tonkinensis* では無処理酵素液 5.2cc より処理酵素液 3.8cc, *Rh. peka* の無処理酵素液 4.0cc より処理酵素液 2.8cc に減少している. 無処理酵素液, 処理酵素液の α -amylase, S-amylase と pH との関係曲線は殆んど変わらないが S-amylase 失活度は α -amylase に比して僅かであつた.

2) Protease 作用と pH との関係

Fig. 3. *Rhizopus* protease の Gelatin 消化と pH との関係曲線

- 1 *Rh. peka* 麩 Protease
2 *Rh. javanicus* 麩 Protease
(1) *Rh. peka* 米 Protease
(2) *Rh. javanicus* 米 Protease

Fig. 4. *Rh. peka* protease の蛋白消化と pH との関係曲線

- 1 Milk Casein
2 Hemoglobin
3 Soybean casein

(280)

(坂本, 守随) 微生物の生産する酵素並びに其の利用に関する研究 (第7報)

(1) Gelatin 基質 麴培養麴酵素液では Fig.3に示す如く *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis*, *Rh. peka* の何れも pH 上昇に従ひ Formol titer cc は増加し pH=6.5~7.0 範囲内で Peak を示すが米培養麴酵素液では pH=4.0 を Peak として以降漸減し pH=6.5~7.0 で第2の小さな Peak を示した。

(2) Casein, Hemoglobin 基質 麴培養 *Rh. peka* 酵素液に就いて ANSON 法に依り試験した結果は Fig.4に示す如く Milk casein, Soybean casein 二者は pH=3.0, 6.5, Hemoglobin pH=3.5, 7.0 に於いて二つの Peak を示した。次に処理酵素液に依る pH 曲線は Fig.5 に示す如く pH=3.0, 40°C, 30min 処理では Acid protease system 残存し Neutral protease system 失活, pH=6.8 処理では Neutral protease system が残存し Acid protease system が失活した。

実験(1), (2)に於いて供試 *Rhizopus* の Protease は少くとも Acid protease system と Neutral protease system とからなり米培地では前者, 麴培地では後者が主体であった。

3) Protease 作用温度 麴培養 *Rh. peka* protease の各温度下に Casein 消化を ANSON 法に依り試験した結果は 38°C が最適温度で此の場合の消化度を 100 とした時の比較値は Fig.6 の如く低温では作用が鈍く緩慢であるが温度上昇に従い作用性を増加し 35~42°C 附近で活性を

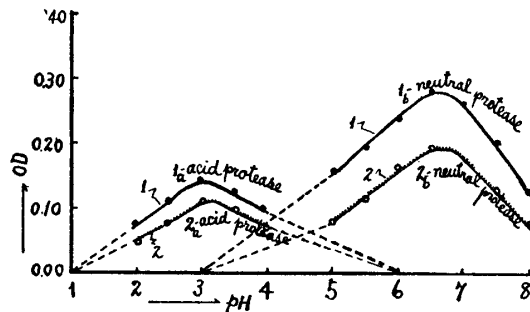


Fig.5. *Rh. peka* pH 処理 Protease の蛋白消化と pH との関係曲線

- 1 Milk casein 基質
- 2 Soybean casein 基質
- 1a pH=3.0 処理酵素液
- 1b pH=6.8 処理酵素液
- 2a pH=3.0 処理酵素液
- 2b pH=6.8 処理酵素液

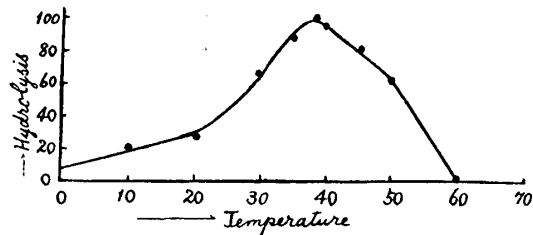


Fig.6. *Rh. peka* protease の Casein 消化と作用温度との関係曲線

示す。50°C 以上では著しく作用減退し 60°C で失活を認められ其の限界は 55°C 附近と思われる。

2. Amylase, Protease 作用経時曲線

1) 糖化曲線 無処理酵素液と pH=3.0, 40°C, 10min 処理酵素液の Soluble starch に対する糖化状況を経時的に調べた Fig.7 では *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis*, *Rh. peka* 共に糖化力大であるが就中前二者は初期に糖生成率大であり中段以降は其程の伸びを示さず, *Rh. peka* に於ては終始緩慢な糖化曲線を示した。

2) 蛋白消化曲線 *Rh. peka*, *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis* protease に依る Gelatin 分解液の生成アミノ酸経時曲線は Fig.8 に示す如く *Rh. peka* の場合初期に急昇し 8hr 内の分解率大であるが以降は緩慢な増加線を示し, 一方 *Rh. tonkinensis* に於ては *Rh. peka* の場合程の極端な急昇曲線は見られず寧ろ緩慢な弓形曲線を示した。 *Rh. javanicus* の場合は *Rh. tonkinensis* に近いが両者の中間位を示した。これを前実験の糖化曲線と比較すると正反対の結果即ち *Rh. peka* amylase の糖化曲線は緩慢な弓形曲線であつたが其の Protease の消化曲線は V 型に近い形状であり, *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis* amylase の糖化曲線は急昇曲線を示すのに対し其の Protease の消化曲線は 其程極端な

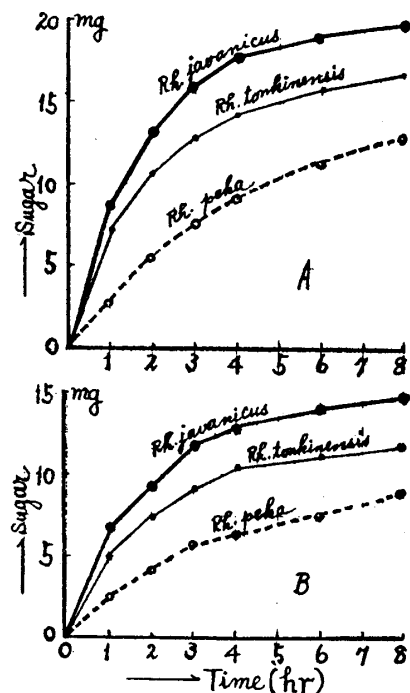


Fig.7. *Rhizopus* amylase に依る糖化曲線

- A 無処理 S-amylase
- B pH 処理 S-amylase

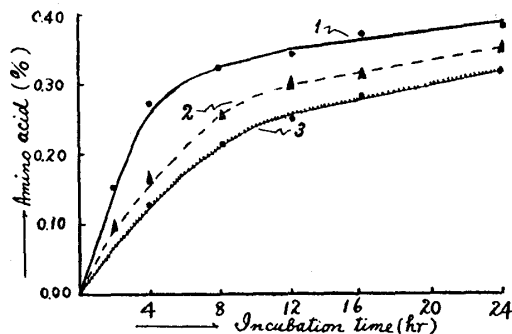


Fig. 8. *Rhizopus* protease に依る Gelatin 消化の経時曲線

- 1 *Rh. peka*
- 2 *Rh. javanicus*
- 3 *Rh. tonkinensis*

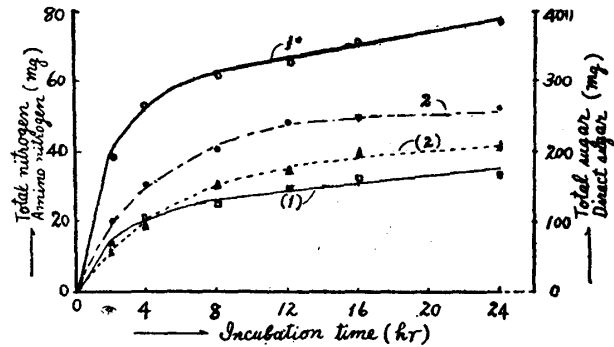


Fig. 9. *Rh. peka* enzyme に依る Soybean 消化の経時曲線

- 1 TCA Soluble nitrogen (1) Amino nitrogen
- 2 Total sugar (2) Direct sugar

曲線を示さなかつた。

3) Defatted soybean powder 消化曲線

Rh. peka 酵素液に依る Soybean 分解の経時曲線は Fig. 9 に示す如くで T.N., A.N. の N-curve は 4hr 内に急昇し, T.S., D.S. の C-curve は 8hr 内に上昇し以後は緩慢な増加曲線を示した。

Ⅲ. 考 察

前報の Black Aspergilli amylase opt. pH=4.2, Greenish-yellow Aspergilli amylase opt. pH=5.2 と対照して *Rhizopus* amylase opt. pH=4.7 は両者の中間値を示した。*Rhizopus* の S-amylase は概して強いに対し α -amylase 弱く, 且 pH=3.0, 40°C, 10min 軽処理に依つても α -amylase の失活大なるに対し S-amylase が比較的安定な事は Black Aspergilli, Greenish-yellow Aspergilli 両者に共通する点のある事も伺える。

糖化曲線に於て *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis* と *Rh. peka* との場合多少の相違点を認められた事は岡崎⁴⁾氏の報告と一致するが, 然し長時間で何れも還元糖を漸増する点では共通性を認められ, 初期曲線の相違は菌株間の酵素力強弱に関連ある事も考慮されねばならず本実験の範囲では此の相違を Amylase の本質であると断定する迄に至らなかつた。

次に, Protease pH 曲線に於て Gelatin 消化から判断出来る事は麩麴では作用 pH 上昇に従い其の酵素力を増加し pH=6.5~7, 米麴では pH=4.0, pH=6.5~7 附近に一応の Peak を示す事, Fig. 4 の Casein 基質から pH=3.0~3.5, pH=6.5~7.0 に Peak を示す事, 且 Fig. 5 の如く pH 処理に依つて二つの Protease に分れる事此等の事実から *Rhizopus* が少なくとも二つの Protease 即ち Acid protease system, Neutral protease system 両者を生産する事は決定的であらう。一方鈴木⁵⁾氏, 茂木⁶⁾氏等は *A. oryzae* protease に Acid protease, Alkaline protease の外 Neutral protease の存在を報告して居るが此の Neutral protease は pH=6 附近で作用至適であるとしている。溯つて坂本⁷⁾は 1955 年既に *A. oryzae* protease が pH=3.0~3.5 opt. acid protease system, pH=5.5~6.0 opt. weak acid protease system, pH=7.5~9.5 opt. alkaline protease system の三者からなる事を報告したが当時としては Weak acid protease system の主張は飛躍過ぎるとして批判されたものの今日に至り其の Weak acid protease system に相当する Neutral protease system が安井⁸⁾氏, 三浦⁹⁾氏, 鈴木⁶⁾氏, 茂木⁶⁾氏等に依つて次々と明らかにされた事は *A. oryzae* protease の一歩前進と云うべきであろう。然らば *A. oryzae* の Neutral protease system-I と本実験の *Rhizopus* neutral protease system-II とは如何程の共通性があるか, 又全然別個のものか此は今後の課題であるが *A. oryzae* の Neutral protease system-I は Alkaline protease system に移る一歩手前の小さな Peak (Alkaline protease の延長として考えられる事, pH 刻みを幅広くとつて結んでしまえば直線となる事の為になかなか気付かない程である) として存在するに対し *Rhizopus* neutral protease-II は C/N ratio 小なる培地に於いて生産される *Rhizopus* の主力 Protease であると云う点で生産面に大きな相違を見られる。然し Amylase の性質から予想すると前記した如く *Rhizopus* amylase と Aspergilli amylase とは可成り共通する点のある事, 且 *Rhizopus* amylase opt. pH が Black Aspergilli, Greenish-yellow Asper-

(282)

(松田, 芝崎) 抗微生物に関する研究 (第5報)

gilli amylase opt. pH の中間値にある事から察して Neutral protease-I, -II は其の性質が可成り近似するのではないかと考えられる (尚, 小さな Peak として Alkaline protease system の存在が見られたが此に就ては暫く保留する)。

次に, *Rhizopus* Protease の作用好適温度38°C, 全失活限界55°Cの結果は他の糸状菌 Protease の場合と同様で特色は認められなかつた。

次に, *Rh. peka* の蛋白分解曲線と糖化曲線とは相反する形状であつたが Protease, Amylase 酵素力の相反する事実から曲線形状の相違は酵素力の強弱に基因するものと解釈する以外本実験の範囲では判断出来なかつた。

総 括

- 1) *Rh. tonkinensis*, *Rh. javanicus*, *Rh. peka* の3株に就いて Amylase, Protease を検討した。
 - 2) Amylase 作用 opt. pH=4.7 で pH=3.0, 40°C, 10min 処理に依り α -amylase の失活大であるが S-amylase は比較的安定であつた。
 - 3) Protease は少くとも Acid protease system, Neutral protease system の二つあり, 其の Opt. pH は前者3.0, 後者6.5附近であつた。
 - 4) 澱粉糖化に於ては *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis* の場合初期に直線的であるが以降は緩慢な上昇線を辿り, *Rh. peka* に於ては終始緩慢な弓形曲線であり, 此は岡崎氏の報告と一致した。
 - 5) 蛋白分解に於ては *Rh. javanicus*, *Rh. tonkinensis* の場合其の曲線は概して緩慢であり, *Rh. peka* に於ては恰も *Rh. tonkinensis* type の糖化曲線の形状に近似した。此の相違は酵素力の強弱に依るものと思われる。
- 終りに臨み御指導を忝うした東大坂口博士, 科研飯田研究員, 富金原研究員, 阪大寺本博士, 照井博士に深謝する。尚, 本研究費は合成清酒組合, 国税庁援助費に依るもので厚礼申上げる。

文 献

- 1) CORMAN, J. and LANGLYKKE, A.F.: Cereal chem. **25**, 191 (1948).
 - 2) PHILLIPS, L.L. and CALDWELL, M.L.: J. Am. chem. Soc. **70**, 3559, 3563 (1952).
 - 3) 福本, 辻阪, 南井: 酵素化学シンポジウム, **9**, 94 (1954), 科学と工業, **28**, 92, 287 (1954).
 - 4) 岡崎: 農化, **24**, 88, 201 (1951); **25**, 317 (1952), 酵素化学シンポジウム口演, 7月 (1955).
 - 5) 鈴木, 布川: 第6回プロテアーゼ研究会口演, 9月 (1956).
 - 6) 茂木, 井口, 吉田等: 醸工, **35**, 150 (1957).
 - 7) 坂本: 合成清酒技術部大会口演, 5月 (1955), 科学術講演会口演, 10月 (1955).
 - 8) 安井: 第2回プロテアーゼ研究会口演, 2月 (1956).
 - 9) 三浦: 第2回プロテアーゼ研究会口演, 2月 (1956).
- (昭 32, 5, 13 受理)

抗微生物に関する研究 (第5報)

パラオキシ安息香酸ブチルの分離定量について

芝 崎 勲・松 田 敏 生 (大阪大学工学部醸酵工学教室)

(本報告の1部は第8回大阪醸造学会講演会にて報告済)

食品, 医薬品等の防腐剤として古くより用いられているパラオキシ安息香酸エステル (PHBA エステル) の分離定量については従来ブロム化法¹⁾, 紫外線吸光度測定法²⁾, MILLON 試薬法³⁾, STOUTON のニトロソ反応による方法⁴⁾, 4-アミノアンチピリン法^{2), 5)} 等が提案せられ, 吾国では衛生検査指針に示されている方法⁶⁾ が常用されている。一方 PHBA エステルを種々の試料より分離する方法としてはエーテル或はアルコールによる抽出法が採用せられている。

著者等は種々の食品に含まれる PHBA エステルを迅速且つ高精度を以て定量する方法を確立せむと企図し, 試料に応じた分離法を設定して, 種々の定量法について比較検討した結果, 紫外線吸光度測定法及び4-アミノアンチピリン法によりその目的を達することが出来たので, 茲に報告する。

本報告では PHBA エステルの内汎用せられるブチルエステル (MP. 71~2°C, 上野製薬株式会社製品) (以下 BPHB と略称する) を供試し, 吸光度測定には島津製ベックマン型分光光度計を用いた。