

〔醸酵工学 第57巻 第1号 1-5. 1979〕

アミラーゼ阻害剤, S-AI 添加による *Bacillus polymyxa* の β -アミラーゼの増産

大山 邦夫・村尾 沢夫

大阪府立大学農学部農芸化学科

Enhancement of β -amylase production of *Bacillus polymyxa* by S-AI, an amylase inhibitor. OHYAMA K. and S. MURAO (Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591) Hakkokogaku 57: 1-5. 1979.

S-AI is a potent α -amylase inhibitor produced by *Streptomyces diastaticus* subsp. *amylostaticus* no. 2476. It is thought to be an oligosaccharide composed of 6 molecules of glucose and 1 molecule of S-AI-X (unknown structure). A small amount of S-AI (5-10 μ g/ml) in the medium enhanced the β -amylase production of *Bacillus polymyxa* no. 72 by about 2-to 3-fold. Addition of S-AI at any time before maximum growth was reached was most effective and thereafter the effect gradually decreased. This effect of S-AI depended on the concentration of soluble starch in the medium. The whole of S-AI was not involved in the effect, because β -amylase hydrolyzate of S-AI (glucose-S-AI-X-glucose) showed the same effect as native S-AI.

β -Amylase was purified from the filtrate of the culture with added S-AI and its properties were compared with those of the enzyme obtained from the control culture without S-AI. No difference was found between the two.

Streptomyces diastaticus subsp. *amylostaticus* no. 2476 は, α -アミラーゼの特異的阻害剤 S-AI を生産する.^{1,2)} S-AI は glucose 6 分子と S-AI-X と名づけた窒素を含む化合物 1 分子によって構成される分子量約1,500の一種の oligosaccharide であり (Fig. 1, 文献1~4 および未発表), 各種の微生物, 動植物起源の α -アミラーゼと glucoamylase のみを特異的に阻害し, β -アミラーゼや pullulanase 等には阻害を示さない.³⁾ S-AI のこのような阻害特異性や阻害機構の解明は, これらアミラーゼの活性部位の研究に多大な知見を与えることが期待される。

一方, 著者らは S-AI のこの阻害特異性を利用して, 高力価の β -アミラーゼ生産菌を効率よく選別する方

法を開発した。すなわち, S-AI を添加した培地を用いて検索することにより, *Bacillus polymyxa* no. 72 など高力価な β -アミラーゼ生産菌数株を, 容易に選別することができた。さらに, その酵素の性質についても検討を加えた (未発表)。

このような検索の過程で, β -アミラーゼ生産菌を S-AI を含む培地で培養すると, β -アミラーゼの生産が, 含まないものに比較して上昇するという興味ある現象が認められた。本報では, β -アミラーゼの生産に対する S-AI の効果について検討した結果を報告する。

実験方法

供試菌および培養方法 実験に供した *B. polymyxa* no. 72 は, 高力価 β -アミラーゼ生産菌として著者らの分離したものである。⁴⁾ 基本培地として 4.0% soluble starch (和光純薬製), 1.0% meat extract (和光純薬製), 1.0% ペプトン (Polypepton, 大五栄養化学製), 0.3% NaCl, pH 7.0 を用いた。培養は 500 ml 容坂口フラスコに上記培地 100 ml を入れ, これにあ

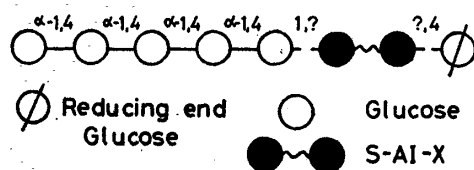


Fig. 1. Postulated structure of S-AI.

らかじめ前培養した種菌を2% (v/v) の割合で接種し、30℃で振とう培養(120回/分)を行った。種菌は同じ条件で24時間培養したものを用いた。遠心分離(10,000 × g, 10 min)により菌体を除去した上澄についてβ-アミラーゼの活性を測定した。

β-アミラーゼ活性の測定 β-アミラーゼ活性は starch を基質として生成される還元糖 (maltose) を dinitrosalicylic acid (DNS) 法⁵⁾で測定して求めた。反応は、soluble starch (キシダ化学)を20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に1.5% (w/v) に溶解させた溶液1 ml に、酵素液0.1 ml を加え、37℃で10分間行った。β-アミラーゼ活性の1 unit は、上記の系で1分間に1 μmol の maltose を生成する酵素量と定義した。

S-AI の調製 添加する S-AI は既報の方法で精製した標品を用いた。⁹⁾また、その阻害活性は bacterial liquefying amylase (BLA) を用いて測定した。⁹⁾

実験結果

S-AI の添加効果

1. 添加濃度の影響 *B. polymyxa* no. 72 のβ-アミラーゼ生産に対する S-AI 濃度の影響を Fig. 2 に示す。S-AI によるβ-アミラーゼの生産増強は0.5 μg/ml の低い濃度の添加においても認められ、約10 μg/ml で飽和し、約90 unit/ml と対照の約2~3倍量のβ-アミラーゼが生産された。なお、菌の生育や酵

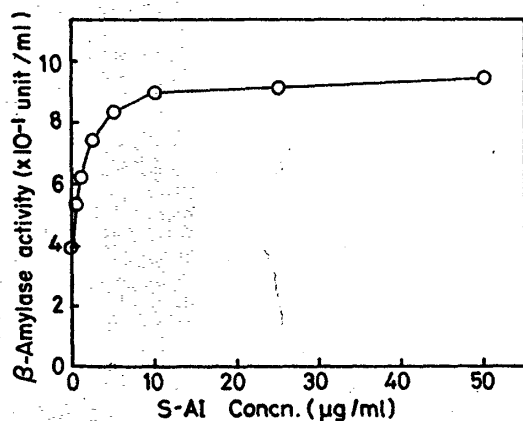


Fig. 2. Effect of S-AI on β-amylase production of *B. polymyxa* no. 72.

B. polymyxa no. 72 was aerobically cultured in the medium containing various concentrations of S-AI. β-Amylase activity in the culture filtrate was assayed after 96 hr cultivation.

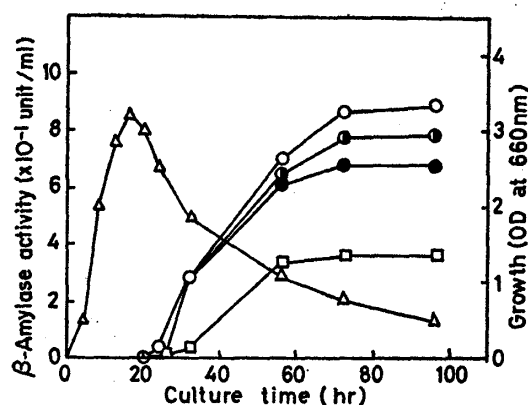


Fig. 3. Relation between addition time of S-AI and β-amylase production.

B. polymyxa no. 72 was cultured under the standard conditions. Two mg of S-AI was added to the cultures (100 ml) at various times. Samples were taken at various times and β-amylase activity was assayed.

β-Amylase activity symbols; —□—, control; —○—, S-AI added at 0, 8 or 16 hr; —●—, S-AI added at 20 hr; —●—, S-AI added at 24 hr. Cell growth is indicated by triangles.

素の生産時期 (Fig. 3 参照) は、いずれの添加においても全く差は認められなかった。

2. 添加時期 種々培養時期に S-AI を終濃度が20 μg/ml となるように添加することにより検討した (Fig. 3)。S-AI は菌の生育が最大となるまでの期間 (0~16 時間) に加えた場合に最も強い効果を示し、定常期以後の添加でも増産効果は認められるが、その割合は時間の経過とともに徐々に減少した。

3. Starch 濃度の影響 本菌によるβ-アミラーゼの生産には soluble starch が重要な影響を示し、starch が存在しない場合、酵素の生産はほとんど見られない。そこで、starch 濃度の S-AI 効果に対する影響について検討した (Fig. 4)。S-AI (5 μg/ml) によるβ-アミラーゼの増産は、いずれの starch 濃度でも見られた。対照と S-AI 添加培地での生産量の比は低濃度 starch の方が大きい。S-AI の添加で増産される酵素量は starch 濃度の高いほど大きい。

4. S-AI の消長 培地に添加した S-AI の消長について調べた結果を Fig. 5 に示す。培地中の S-AI 量は培養ろ液を100℃で15分間加熱処理後、BLA に対する阻害活性より求めた。添加した S-AI は培地中でその活性が急激に減少する。この原因として、(1)

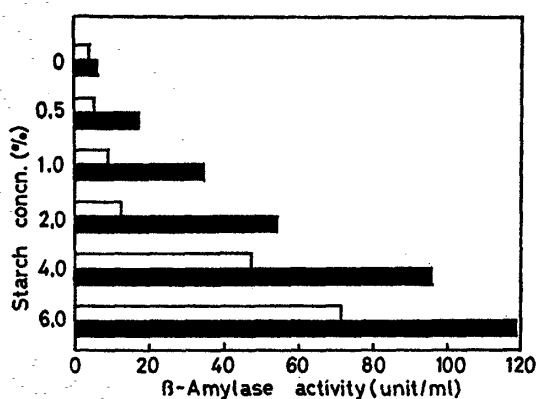


Fig. 4. Acceleration of β -amylase production by S-AI in medium containing different concentrations of starch.

Cells were grown in medium containing various concentrations of soluble starch. β -Amylase activity was assayed after 96 hr cultivation.

□, without S-AI; ■, with S-AI (5 μ g/ml)

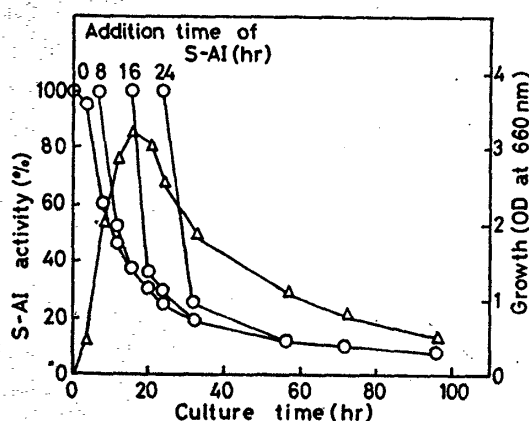


Fig. 5. Decrease of S-AI activity in the culture.

The cells were cultured under the standard conditions and S-AI (20 μ g/ml) was added at various times. Samples were taken at various times and the remaining S-AI activity in the culture filtrate was assayed after heating the sample at 100°C for 15 min.

—○—, S-AI activity; —△—, Cell growth.

添加した S-AI が速やかに菌体内に取り込まれる。

(2) S-AI が生産された β -アミラーゼにより分解され失活する等が考えられる。³⁾ しかし、0 時間や 8 時間目の添加で見られるように、 β -アミラーゼがほとんど生産されていない時期においても、S-AI 活性が同

Table 1. Effect of β -amylase hydrolyzate of S-AI on β -amylase production of *B. polymyxa* no. 72.

Addition	β -Amylase activity (unit/ml)
None (control)	42.0
S-AI (2.5 μ g/ml)	92.0
Hydrolyzate	92.8

β -Amylase hydrolyzate of S-AI was prepared by incubating S-AI with sweet potato β -amylase at 37°C for 5 hr and heating at 100°C for 10 min. This was added to culture medium at a concentration of 2.5 μ g/ml as native S-AI. Cells were cultured for 96 hr under the standard conditions and β -amylase activity in the culture filtrate was assayed.

様に減少している点を考慮すると、(1) の原因が強いものと推定される。すなわち、S-AI が菌体内に取り込まれて作用しているものと推定される。

5. S-AI の部分分解物の効果 S-AI の効果の発現にその全構造が必要かどうかを、S-AI の β -アミラーゼ分解物を用いて検討した。すなわち、S-AI は β -アミラーゼの作用により maltose (F-I) 2 分子と S-AI-X を含んだ画分 (F-II, glucose-S-AI-X-glucose) 1 分子に分解され、同時に BLA に対する阻害活性をほとんど消失する (文献 3 および未発表)。分解物の調製は、S-AI 250 μ g を 5 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2 ml に溶解し、これに甘藷の β -アミラーゼ (Sigma) 5 μ g を加え、37°C、5 時間反応後、100°C で 10 分間加熱処理することにより行った。Table 1 に示すように、分解物の添加によっても S-AI と同様な効果が認められた。maltose のみではこのような作用は認められず、従って S-AI-X を含んだ F-II が S-AI と同じ効果を示すことが明らかとなった。

S-AI 添加時に生産される β -アミラーゼの性質

S-AI の添加により増産される酵素が、無添加時の酵素と同じものかどうかは、S-AI の添加効果を解明する上で重要な問題と考えられる。そこで S-AI 添加培地で生産される酵素を精製し、その性質を無添加の場合のものと比較した。

1. 酵素の精製 *B. polymyxa* no. 72 を 5 μ g/ml の S-AI を含んだ培地で、30°C、96 時間振とう培養後菌体を除いた培養ろ液 5 l を用い、無添加培養で行ったと全く同じ方法 (未発表) で精製した。すなわち、

Table 2. Some properties of β -amylases I and II produced in the presence or absence of S-AI.

	Control culture	S-AI (5 μ g/ml)
Specific activity (unit/OD ₂₈₀)	149*, 145**	150*, 149**
Optimum pH	7.5	7.5
pH stability	4.0—9.0	4.0—9.0
Optimum temperature	45°C	45°C
Thermal stability	below 50°C	below 50°C
Isoelectric point	8.35*, 8.59**	8.35*, 8.55**
Molecular weight	44,000	45,000
Inhibition by PCMB	Yes	Yes

* Values of β -amylase I** Values of β -amylase IIOther properties of β -amylase I and II were same.

starch に対する吸着, 硫安分画, DEAE-cellulose, CM-cellulose イオン交換クロマトグラフィー, Bio gel P-100 ゲルろ過, Ampholite (pH 7~10) 焦点電気泳動により β -アミラーゼとして無添加の場合と同様に, 等電点の若干異なった2つの標品, β -amylase I と β -amylase II が得られた. I, II はいずれも電気泳動的に均一に精製され, 培養液 1 l からの収量(全活性)は I が 3.4×10^8 unit (収率4.1%), II が 1.7×10^8 unit (収率2.1%) であった.

このようにして得られた β -amylase I と II の比率は約2:1であり, この値は S-AI 無添加培養の場合と同じであった. すなわち, S-AI がこれら2種の β -アミラーゼの生産を同程度に増強していることが示唆された.

2. 酵素の性質 精製酵素について, その諸性質を無添加のものと比較した. それらの結果をまとめて Table 2 に示す. S-AI 添加および無添加培地で生産される酵素には, 酵素化学的諸性質, 等電点, 分子量等いずれも有意な差は認められなかった.

考 察

S-AI はアミラーゼ阻害剤としての作用の他に, 微生物の代謝に対しても影響を示し, 微量の添加で *B. polymyxa* no. 72 の β -アミラーゼ生産を顕著に増大させた. 今後, S-AI の効果を生理学的に詳細に検討することにより, β -アミラーゼの生成や菌体外への分泌機構, あるいは菌体内および菌体外のアミラーゼの役割といった点について, 有意義な知見が得られるものと期待される.

なお, 本実験で β -アミラーゼ活性の測定に用いた DNS 法では, 混在する α -アミラーゼ活性による影響が考えられる. しかし培養液を用いた検討の結果, (1) starch を基質とした時の分解限度が約60%であり, その生成物がほとんど maltose であること, (2) この活性が *p*-chloromercuribenzoic acid でほとんど失われることから考えて, 本菌の場合, α -アミラーゼの影響は無視できるものと思われる.

また, 興味ある点は, S-AI の β -アミラーゼによる分解物 (F-II, glucose-S-AI-X-glucose) が BLA に対する阻害活性を示さないにもかかわらず, β -アミラーゼの増産に関しては S-AI と同じ活性を示す点である. この結果は, F-II さらには S-AI-X が S-AI の阻害剤としての作用に重要な役割を持つだけでなく, 微生物の生理にも何等かの影響を持つことを示唆するものであろう.

要 約

アミラーゼ阻害剤 S-AI は一種の oligosaccharide であり, *B. polymyxa* no. 72 の β -アミラーゼ生産に対し, 興味ある生理効果を示した.

1) 本菌の β -アミラーゼ生産は 5~10 μ g/ml の S-AI の添加で2~3倍に増大した.

2) S-AI のこの効果は, 菌の生育が最高に達するまでの添加が特に有効であった. また, この効果は培地中の starch 濃度に影響され, 増加率で見ると低い濃度の方がより効果的であった. ただ, S-AI 添加で増加する酵素の量は, 高い starch 濃度で大きかった.

3) 添加された S-AI は, 培養液中で急激にその阻

害活性 (BLA に対する) が減少しており, 菌体内への取り込みが予想された。

4) β -アミラーゼの増産には, S-AI 分子の全構造が必須ではなく, S-AI の甘藷 β -アミラーゼ分解物 (glucose-S-AI-X-glucose) でも全く同じ効果が認められた。

5) S-AI の添加で得られる酵素は, 無添加の場合と酵素学的, タンパク化学的に同一であった。

本研究を遂行するに当たって, ご助力をいただいた服部宏仁氏に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) Murao, S., Ohyama, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2271 (1975).
- 2) Murao, S., Ohyama, K., Ogura, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 919 (1977).
- 3) Ohyama, K., Murao, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2221 (1977).
- 4) 村尾 : 科学と工業, **51**, 1 (1977).
- 5) Mollting, G., Bernfeld, P. : *Helv. Chim. Acta*, **31**, 286 (1948).

(昭53. 9. 21 受付)