

[醸工 第43巻, 第7号, p.475~480, 1965]

## *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の生産する 糖化アミラーゼについて

(第3報) 糖化アミラーゼの2, 3の性質

上山英夫・富金原 孝

(理化学研究所醸酵工学研究室)

照井 堯 造

(大阪大学工学部醸酵工学教室)

### Studies on Saccharifying Amylase Produced by *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 in Submerged Culture

(III) General Properties of Saccharifying Amylase

Hideo Ueyama, Takashi Fukinbara and \*Gyozo Terui

(The Institute of Physical and Chemical Research, Bunkyo-ku, Tokyo; \*Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University, Higashinoda, Osaka)

The stability of saccharifying amylase produced by *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 in submerged culture was investigated with the enzyme preparation unique with regard to the patterns of Tiselius-electrophoresis and ultracentrifugation. It was shown that, in acidic pH range, the enzyme is much more stable than the saccharifying amylase of *Rhizopus*. Apparent activation energies of heat inactivation at pH 5.3, 4.1 and 3.1 were estimated to be 68.2, and 39.1, 65.2 respectively. With soluble starch as substrate, Michaelis constant had a value of  $2.5 \times 10^{-1}$  (g/l) at pH 5.3 and 40°C.

### 緒 言

前報<sup>1)</sup>で *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の液内培養により生産される糖化アミラーゼは酸性溶液の状態できわめて安定であることを報告した。養田ら<sup>2)</sup>はすでに耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼにつき報告しているが著者らの糖化アミラーゼも同様に耐酸性糖化アミラーゼであることを *Rhizopus* 属の生産する糖化アミラーゼとの比較検討を行ない、かつ、2, 3の諸性質を検討した結果につき報告する。

### 実 験 方 法

糖化アミラーゼの測定法は前報<sup>1)</sup>と同様であり、精製標品についての酵素濃度と生成グルコース量の関係を Fig. 1 に示す。

*Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の糖化アミラーゼ標品は前報<sup>3)</sup>で精製したものを使用した。

非耐酸性糖化アミラーゼとしては *Rhizopus* 属の生産物を使用した。硫酸塩析物を水抽出し、透析後アセトン沈澱により0~70%の沈澱区分をとる。アセトン沈澱物を蒸留水に溶解し濃縮後リパノール溶液を加える。この

処理により黒色々素, 粘質物および不純蛋白質の一部が沈澱する。上澄を酸性白土処理により, リバノール, 残存する色素および不純蛋白質を除去する。ついでアセトン分画を行ない40~55%の沈澱区分をとりこれを供試酵素液とした。

### 実験結果

#### 最適作用 pH

最適作用 pH を前報<sup>1)</sup>と同様の糖化アミラーゼの測定法によりこの起源の異なる2種類の糖化アミラーゼについて比較したところ Fig. 2 に示すように *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の糖化アミラーゼ F-1 ならびに F-2 は *Rhizopus* 属の生産する糖化アミラーゼに比較して作用 pH は酸性側に偏倚している。しかし, 最適作用 pH は両者とも pH 5 近辺に存在する。いずれにしても pH 作用に関しては極端な差はみられなかった。ここで使用した緩衝液は pH 2~3 を 1/5 M 塩酸-塩化カリウム緩衝液, pH 3~4 を 1/5 M グリシン-塩酸緩衝液, pH 4~5 を 1/5 M 醋酸-醋酸ナトリウム緩衝液, pH 6~8 を 1/5 M 燐酸緩衝液, pH 9~10 を 1/10 M ベロナル-塩酸緩衝液とした。

#### 安定 pH 域の比較

安定 pH 域を2種類の起源を異にする糖化アミラーゼについて比較したところ Fig. 3 に示すような結果が得られた。実験方法は酵素液 1 ml に各 pH の緩衝液 1 ml を添加して 30°C, 24時間放置後の残存糖化アミラーゼ作用を測定したものである。

*Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の糖化アミラーゼ F-1 ならびに F-2 は *Rhizopus* 属の糖化アミラーゼに比較するとき低 pH 領域において安定であり, pH 2.5 で明確に区別され, *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の糖化アミラーゼ F-1 ならびに F-2 の50%程度残存する pH において *Rhizopus* 属の糖化アミラーゼは完全に失活していることを確認した。

#### 熱失活速度

*Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の糖化アミラーゼと *Rhizopus* 属の糖化アミラーゼは Fig. 3 に示したように酸性領域において明らかに区別された。しかもこの実験条件はこの時間範囲において安定 pH 域では酵素の熱失活を無視できる条件である。そこで糖化アミラーゼ作用の失活を pH および温度を変化させて2種類の起源を

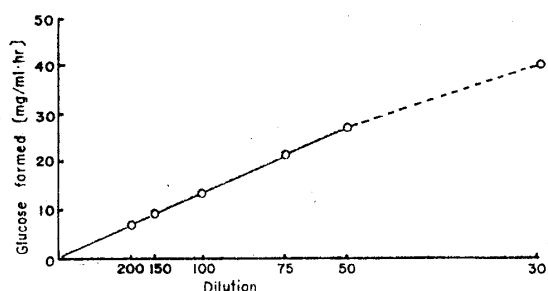


Fig. 1. Relation between concentration of enzyme and glucose formed.

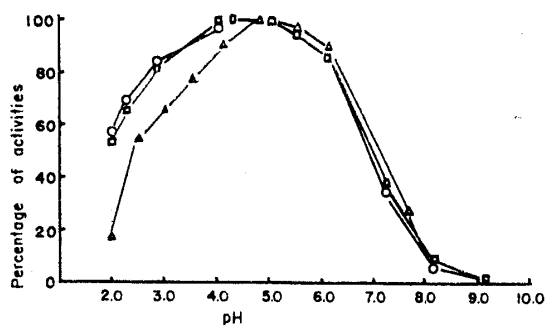


Fig. 2. Relation between pH and saccharifying activity. pH 2.0~3.0 1/5 M HCl-KCl buffer; pH 3.0~4.0 glycine-HCl buffer; pH 4.0~5.0 1/5 M acetate buffer; pH 6.0~8.0 1/5 M phosphate buffer; pH 9.0~10.0 1/10 veronal-HCl buffer ○—○ F-1; □—□ F-2; △—△ *Rhizopus* sp. s-amylase.

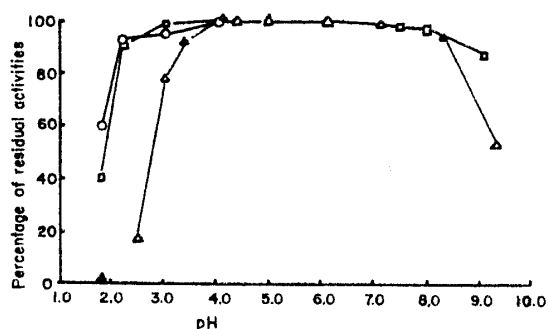


Fig. 3. Relation between pH and stability of saccharifying and dextrinizing activity.

Residual activity after storage for 24 hrs at 30°C. Each pH value were adjusted same as Fig. 2.

Maximal remaining activity showed 100% activity.

異にする糖化アミラーゼについて比較するためにつぎのような実験を行なった。なお、本実験では *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の糖化アミラーゼを F-2 に限定した。温度を 30, 40, 50, 55 および 60°C に設定し、各温度において pH を 5.3, 4.1, 3.0, 2.5 および 1.75 に変化せしめ熱失活を経時的に測定した。糖化アミラーゼ F-2 について得た結果を Fig. 4~8 に、*Rhizopus* 属の糖化アミラーゼについて得た結果を Fig. 9~12 に示す。この結果は見かけ上の失活が 1 次反応式に従うことを示す。そこで 1 次反応速度式を適用して熱失活速度定数  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) を求めた。この結果得られた諸数値を糖化アミラーゼ F-2 については、Table 1 に、*Rhizopus* 属の糖化アミラーゼについては Table 2 に示す。この 2 種類の起源を異にする糖化アミラーゼはきわめて類似

した作用機作および失活がともに 1 次反応式に従うことを考慮すれば Table 1 ならびに Table 2 を比較することによって同一条件下における耐酸性の程度を知

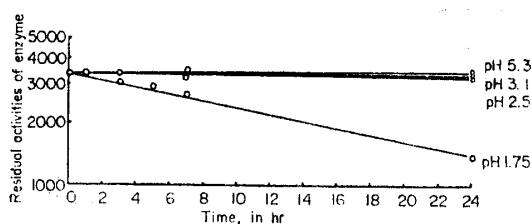


Fig. 4. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Aspergillus niger* U<sub>20</sub>-2-5.

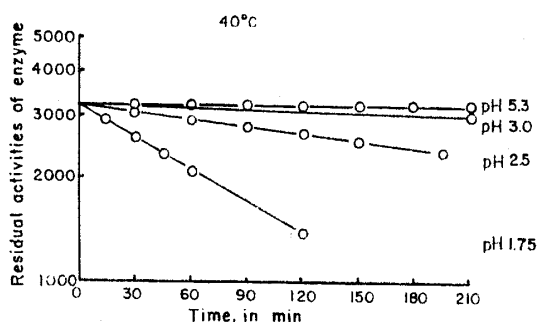


Fig. 5. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5.

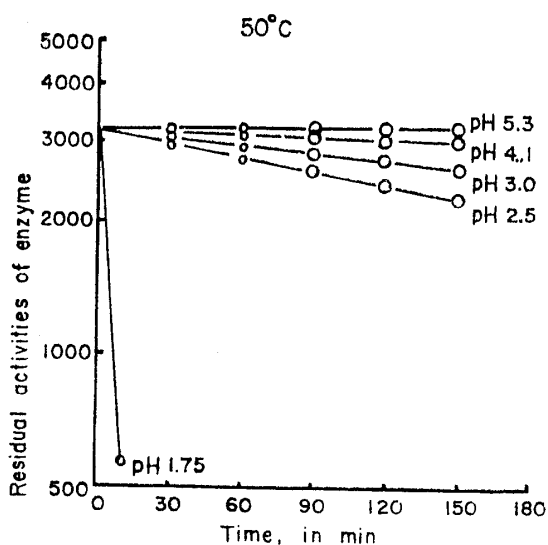


Fig. 6. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5.

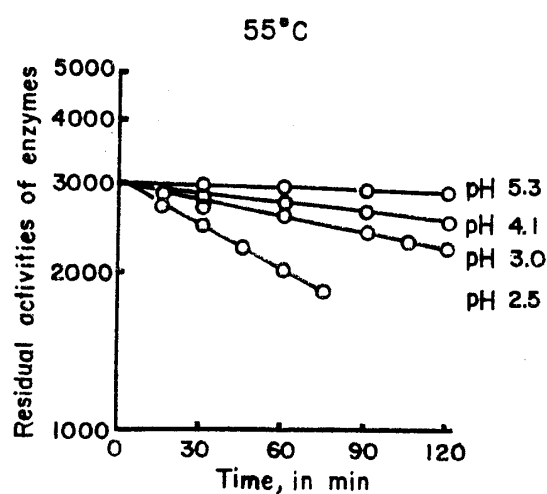


Fig. 7. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5.

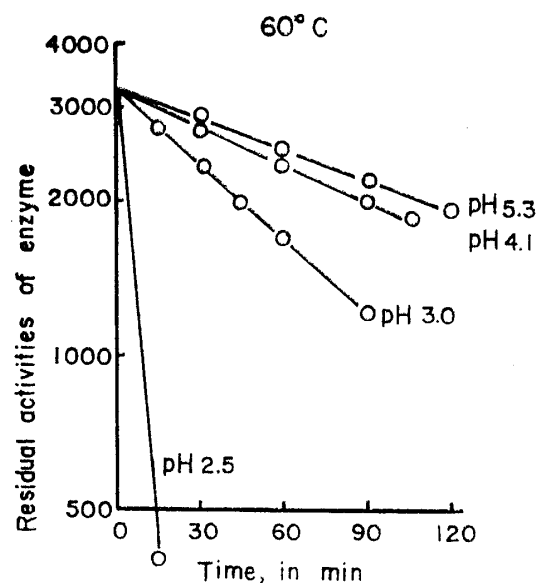


Fig. 8. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5.

ることができる。糖化アミラーゼ F-2 はいかなる条件下において比較しても *Rhizopus* 属の糖化アミラーゼよりも明らかに耐酸性で、相対的に耐酸性を明示することができる。糖化アミラーゼ F-2 について見かけの活性化エネルギーを、Arrhenius の式に従って  $1/T \sim \log k$  をプロットして求めた。この結果は Fig. 13 にみられるように pH 5.3, 4.1 および 3.0 においては直線関係が得られ、見かけの活性化エネルギーとしてそれぞれ 68.23, 65.17 および 39.10 [kcal/mol] を得た。なお、pH 2.5 においてはこの関係が成立しなかった。

#### ミカエリス定数におよぼす pH の影響

*Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の生産する糖化アミラーゼ F-2 を使用して澱粉を糖化する場合、生成物の影響などがない条件下で pH が糖化にかなる影響をおよぼすかについて検討した。基質として可溶性澱粉を使用した。ここで反応初速度を求め Michaelis-Menten 式の Lineweaver-Burk 変形式に基づいて Michaelis 定数  $K_m$  および最大反応速度  $V_m$  を求めた。この結果を Fig. 14 に示す。なお、本報告の実験方法に基づけば測定中の酵素の失活が起らない。 $K_m$  は低 pH において幾分高い値を示し、 $V_m$  は減少している。

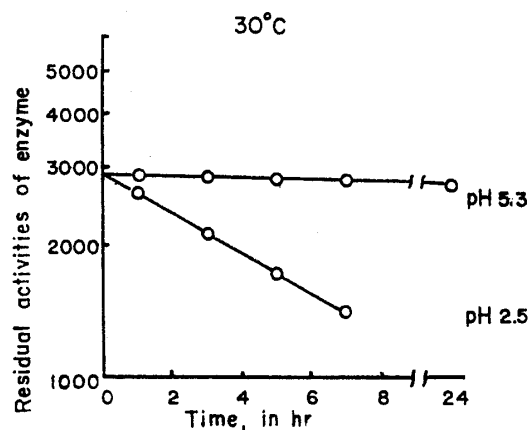


Fig. 9. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Rhizopus* sp.

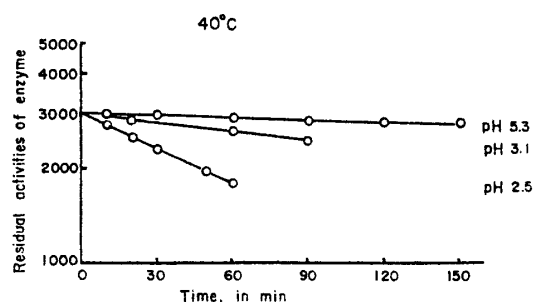


Fig. 10. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Rhizopus* sp.

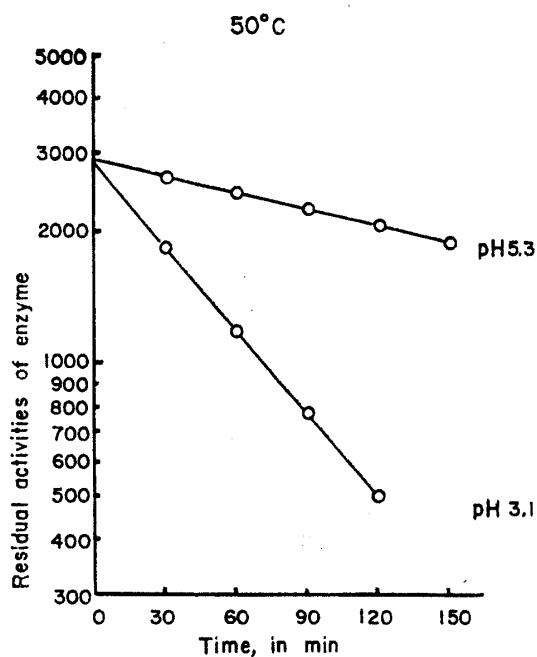


Fig. 11. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Rhizopus* sp.

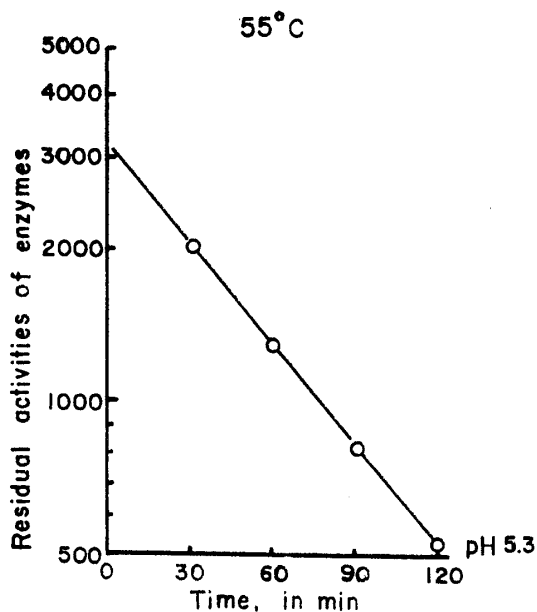


Fig. 12. Relation between pH and stability of saccharifying amylase produced by *Rhizopus* sp.

Table 1. Rate constant of heat-inactivation of saccharifying amylase F-2 produced by *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5.

| pH [—] | <i>k</i> [min <sup>-1</sup> ]      |                       |                       |                       |                       |
|--------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|        | Temperature [°C]                   |                       |                       |                       |                       |
|        | 30                                 | 40                    | 50                    | 55                    | 60                    |
| 5.3    | 10 <sup>-6</sup> ~10 <sup>-7</sup> | 6.31×10 <sup>-6</sup> | 1.05×10 <sup>-4</sup> | 7.08×10 <sup>-4</sup> | 4.52×10 <sup>-3</sup> |
| 4.1    | 10 <sup>-6</sup> ~10 <sup>-7</sup> | 7.60×10 <sup>-6</sup> | 3.94×10 <sup>-4</sup> | 1.13×10 <sup>-3</sup> | 5.80×10 <sup>-3</sup> |
| 3.1    | 3.06×10 <sup>-5</sup>              | 3.14×10 <sup>-4</sup> | 1.36×10 <sup>-3</sup> | 3.55×10 <sup>-3</sup> | 1.14×10 <sup>-2</sup> |
| 2.5    | 4.22×10 <sup>-5</sup>              | 1.53×10 <sup>-3</sup> | 2.61×10 <sup>-3</sup> | 6.08×10 <sup>-3</sup> | 1.14×10 <sup>-1</sup> |
| 1.75   | 8.77×10 <sup>-4</sup>              | 6.94×10 <sup>-3</sup> | 1.74×10 <sup>-1</sup> | —                     | —                     |

Table 2. Rate constant of heat-inactivation of saccharifying amylase produced by *Rhizopus* sp.

| pH [—] | <i>k</i> [min <sup>-1</sup> ] |                       |                       |                       |
|--------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|        | Temperature [°C]              |                       |                       |                       |
|        | 30                            | 40                    | 50                    | 55                    |
| 5.3    | 1.70×10 <sup>-5</sup>         | 2.83×10 <sup>-4</sup> | 3.53×10 <sup>-3</sup> | 1.82×10 <sup>-2</sup> |
| 3.1    | —                             | 1.78×10 <sup>-3</sup> | 1.47×10 <sup>-2</sup> | —                     |
| 2.5    | 1.70×10 <sup>-3</sup>         | 8.22×10 <sup>-3</sup> | —                     | —                     |

### 最適作用温度

*Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の生産する糖化アミラーゼ F-1 ならびに F-2 の最適作用温度を本実験において採用した糖化アミラーゼの測定法にもとづき 30, 40, 50, 55, 60 および 65°C における生成グルコース量として Fig. 15 に示すような結果を得た. 最適作用温度は F-1 および F-2 とともに 60°C であった.

### 考 察

*Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の液内培養により生産される糖化アミラーゼ F-1 ならびに F-2 の 2, 3 の性質につき検討したが, この両者はきわめて類似した性質を示し, 前報<sup>3)</sup> で報告した電気泳動による挙動が異なること以外においては安定 pH 域が F-1 の方が F-2 よりも酸性領域に偏倚していることのみが差のある点である. *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の生産する糖化アミラーゼは *Rhizopus* 属の生産する糖化アミラーゼに比較してきわめて耐酸性が大であることはここに報告した結果より明らかである.

低 pH 域における糖化アミラーゼ F-2 の熱失活において見かけ活性化エネルギーが Ca 39.1 [k cal/mol] のように比較的低い値を示したことは低 pH 域における失活が蛋白質の変性過程において起ると考えるとき, 変性過程はきわめて鋭敏に [H<sup>+</sup>] によって攪乱されるものと考えられる.

### 要 約

*Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の液内培養により生産される糖化アミラーゼを *Rhizopus* 属の生産する糖化アミラーゼと比較するとき酸性領域においてきわめて安定であり, 耐酸性糖化アミラーゼであることを確認した.

*Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5 の糖化アミラーゼ F-2 の熱失活の見かけの活性化エネルギーは pH 5.3, 4.1

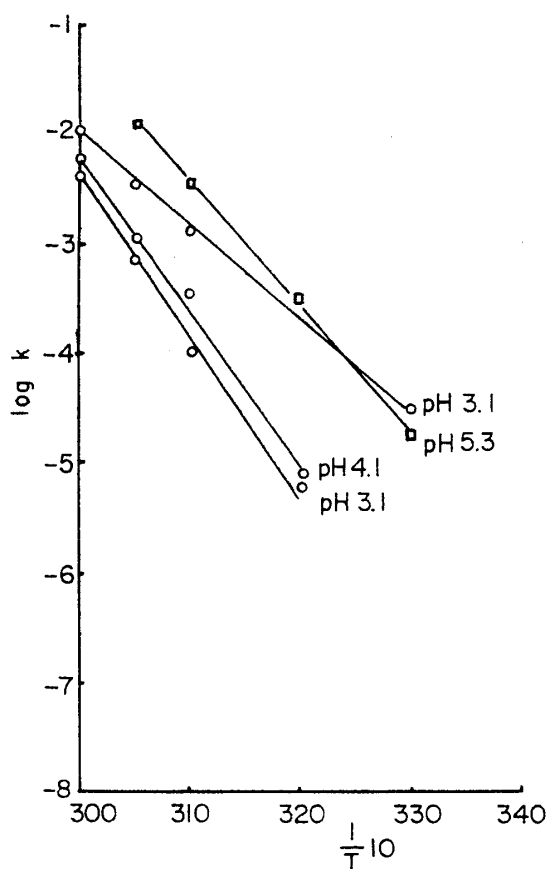


Fig. 13. Relation between  $1/T$  and  $\log k$  on heat-inactivation of saccharifying amylase.

○ : s-amylase of *Aspergillus niger* U<sub>20</sub> 2-5  
 □ : s-amylase of *Rhizopus* sp.

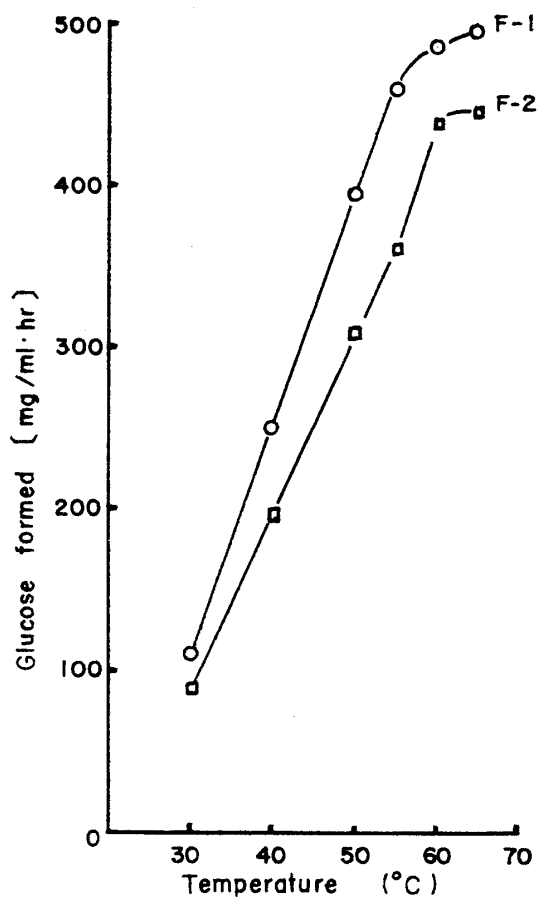


Fig. 15. Relation between temperature and saccharifying activity as determined in acetate buffer at pH 5.0.

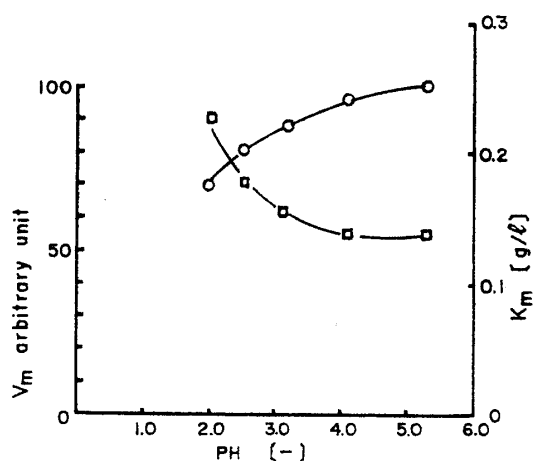


Fig. 14. Effects of pH on  $V_m$  and  $K_m$  5/1 M HCl-KCL buffer for pH 2.0~3.0 1/5 M glycine-HCl buffer for pH 3.0~4.0. 1/5 M acetate buffer for pH 4.0~5.0.

○ :  $V_m$  □ :  $K_m$

および 3.0 においておのおの 68.23, 65.17 および 39.10 [kcal/mol] であり,  $K_m$  は pH 5.1, 40°C なる条件において  $2.5 \times 10^{-1}$  [g/l] を可溶性澱粉に対して得た。

本報告は昭和39年度日本醸酵工学会大会一般講演において報告した。

#### 文 献

- 1) 上山, 照井, 北田: 本誌, **42**, 593 (1964).
- 2) 山田, 養田: 醸協誌, **29**, 254 (1962).
- 3) 上山, 富金原, 照井: 本誌, **43**, 228 (1965).

(昭 40. 3. 24受付)