

〔醸工 第45巻, 第2号, p. 92~102, 1967〕

液体麴の酵素バランスおよびその清酒醸造への応用

(第4報) 酵素生成に対する糠中有効成分の検索
とくに phytin の添加効果について

三吉 和重・照井 堯造

(大阪大学工学部醸酵工学教室)

Studies on the Activity Balance of Enzymes in Submerged Fungal Culture Fluid Used as a Substitute for Koji in Sake-brewing

(IV) On the Component of Rice Bran, Especially Phytin, Effective in Promoting Enzyme Production

Takashige Miyoshi and Gyozo Terui

(Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,
Osaka University, Higashinoda, Osaka)

The phosphate fractionation method was applied to rice bran in order to isolate the components effective in producing hydrolytic enzymes in submerged fungal culture. Acid-soluble, acid-nonextractable and (phospholipids-) fractions were effective in α -amylase production. And alcohol-soluble fraction obtained after precipitating nucleic acids according to the method of Le Page²⁾ had an accelerating action upon protease formation.

Dilute hydrochloric acid extract of rice bran was effective in promoting the secretion of α -amylase and acid protease, but without significant effect with regard to glucamylase and protease (pH 7.0). The effectiveness of the acid extract could be mainly attributed to phytin, which is especially effective in α -amylase production; no other fraction had such a remarkable effect. It has already been known that α -amylase formed in young mycelia of *Aspergillus oryzae* grown in a synthetic medium⁸⁾ is mostly found in a state adsorbed firmly on cell wall and is hardly secreted into the medium. Phytin was proved to be very effective in eluting the adsorbed α -amylase. It was much more effective than inorganic phosphate. At a concentration of 0.1% in the medium, phytin was effective in promoting α -amylase production.

緒 言

液体麴製造培地の不用物質が除去できれば、液体麴法を清酒醸造工程に取り入れる場合その品位の向上に役立つと考えられる。そこで培地有効成分として使用した米糠(脱脂米糠)を、さらに分画し、酵素生産に対していかなる物質が有効か調べた。糠の分画はリン酸分画法^{1,2)}を適用し、分画製品に対して有効性を検査するとともに、とくに一成分として糠中にかなり多く含まれている phytin⁴⁾に着目し、酵素生産に対する効果を検討した。Phytin の添加効果については Dunn ら⁵⁾、寺本ら⁶⁾が α -amylase, glucamylase の生産に有効であることを認め

ているが、私達は各種酵素群の内 α -amylase について検討し、その直接的な効果として、菌体に内生する α -amylase の培地中への放出に影響することを認めた。

実験方法

1. 培養方法 原則として *Asp. oryzae* Un-3 菌を用い、培地組成：可溶性デンプン 6%, グルタミン酸ソーダ 1%, NaNO_3 0.3%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, pellet 防止剤として 100~200 mesh セルロース粉末 3% (これにてほとんど pulp 状の菌体を得られる) を含む基本培地で、フラスコ振盪前培養 2~3 日の菌体を遠心分離して集め、2 回殺菌水道水にて洗浄する。これをセルロース粉末を抜いた同一基本培地 (適当量の緩衝液を含む) に検査物質を加えた培地に置換して振盪培養し、その酵素生産性を調べた。菌体乾燥重量はセルロース粉末や糠の不溶性物質重量を別に培地組成と同一量かつ無菌にて同一時間振盪した後、乾燥したものを換算してさし引き真正菌体量として求めた。

2. 米糠分画 米糠は市販米糠および脱脂米糠 (日本精穀油脂工業株式会社製) を用い、リン酸分画法^{1,2)}に従って行なった。すなわち Scheme 1 に示すように脱脂米糠 (50 mesh 以上), 市販米糠各 50g を 2°C で 5% 冷過塩素酸にて抽出 2 回 (第 1 回 1 時間半, 2 回目 30 分), ついで 2.5% 冷過塩素酸にて 30 分抽出し濾過, 全濾液を合わせ [酸可溶区分], この濾液に conc KOH を加えて中和し, 生じた白色沈澱物を遠心分離する。得た沈澱物は蒸留水 2 回洗浄後 1N HCl に溶かし, 不溶の過塩素酸カリなどを取除いた後, KOH 中和, HCl 溶解の再沈澱操作を 3 回くり返して [酸中和沈澱区分…A.N.] とする。KOH 中和沈澱除去の上澄は減圧濃縮後, Le Page の方法²⁾に従って, pH 8.2 (フェノールフタレインピンク) とした後, 酢酸バリウム溶液を添加して沈澱する区分 [Ba⁺⁺ 沈澱区分…A. Ba.] としない区分に分画する。沈澱しない区分はさらに減圧濃縮後 4 倍量の 95% アルコールを加え, 生じた沈澱物 [アルコール沈澱区分…A. Alc.] と残り [非沈澱区分…A. D.] に分画した。

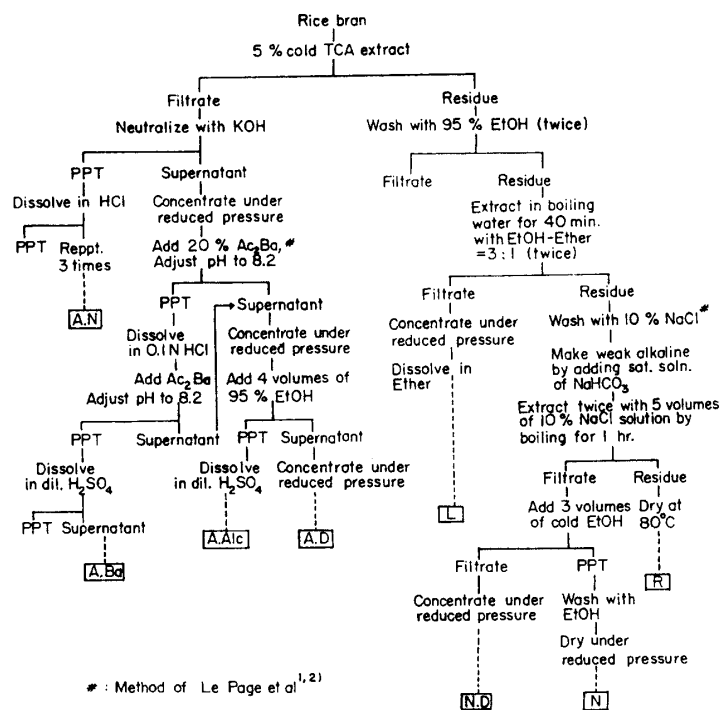
過塩素酸抽出残渣は 95% アルコールにて 2 回洗浄濾別後, 残渣にエタノール:

エーテル = 3 : 1 液を加え, 一夜室温放置後 40 分沸騰水浴中にて抽出濾過, さらに同溶媒にて 40 分同様抽出し, これらの濾液を合わせ減圧濃縮して [リン脂質区分…L] とする。この濾過残渣は Le Page らの方法²⁾に従って 10% 食塩溶液約 300ml を加え, かつ 1N NaOH にて中和後重炭酸ソーダ飽和溶液にてわずかにアルカリ性液として洗浄濾過する。この残渣に 5 倍容の 10% 食塩溶液を加え, 同様重炭酸ソーダ飽和溶液にて稀アルカリとなし, 沸騰水浴中にて 1 時間抽出 (2 回) を行ない濾過, 濾液に 3 倍容の冷アルコールを加え 2°C に一夜放置後, 生じた沈澱をアルコールにて 2 回洗浄後減圧乾燥して [核酸区分…N] とする。非沈澱区分は減圧濃縮して [アルコール非沈澱区分…N.D.] とする。10% 食塩抽出残渣は 80°C にて乾燥して [残渣区分…R] とする。

得た製品の使用にあたっては全量が糠 50g に相当するものとして必要計算量をそれぞれ使用した。

3. 酵素力価測定など 酵素力価測定および一般分析方法は前報⁷⁾と同じであるが、糖定量は以後 Somogyi 法によっている。

Scheme 1. Procedure for the fractionation of phosphates in rice bran extracts.



4. リン酸の定量 リン酸の定量は Fiske-Subbarow 法^{2,3)} によって行ない、無機リン酸の定量法に従って測定した値を Direct-P として表わし、酸分解によって測定した値を Total-P として表わした。Total-P の測定における酸分解は 60%過塩素酸 2ml を試料と共にマイクロケルダールフラスコにとり、加熱、白煙が出るにおよび中止し冷却後少量の蒸留水を加えてさらに加熱 (10~30分)、全てのリン酸を正リン酸の形となし冷却する。冷却後全量を 15ml として分析試料とする。なお酸分解に 60%過塩素酸 2ml を用いたが、測定試料 phytin に対し 10N H₂SO₄ 0.5ml によって酸分解を行なった場合も両者に差はみられなかった。また森らの方法⁴⁾を行なった場合もほぼ同様の値を得た。

5. Ca-Phytate Ca-phytate は市販 phytin (東京化成工業株式会社製) を用いた。また実験Ⅲにおいてはつぎのような手段によって再沈澱して用いた。Phytin 1g (total P 4.7 μ mole/mg) を 0.5N HCl 30ml に溶解後、その溶液に 20%塩化カルシウム溶液 3ml を加えさらに KOH にて中和する。生じた沈澱は遠心分離して上記手順を 1 回くり返して再沈した phytin を 0.5N HCl に溶解、最終液量 30ml とした (total P として 5.65 μ mole/mg または 188 μ mole/ml, direct P は 1.14 μ mole/mg または 38 μ mole/ml)。

使用にあたってはこの溶液 1ml を採り pH を調整して最終液量 40ml に希釈した。pH は 5 および 7.8 としここで調整した溶液をそれぞれ pH 5 溶液および pH 7.8 溶液とする (total P として 4.8 μ mole/ml, direct P は pH 5 溶液で 0.96, pH 7.8 溶液で 0.33 μ mole/ml)。

実験結果および考察

I. 糠のリン酸分画各成分の酵素生産への添加効果 500ml 容フラスコ 3 本にて前培養 (ただし培地組成:

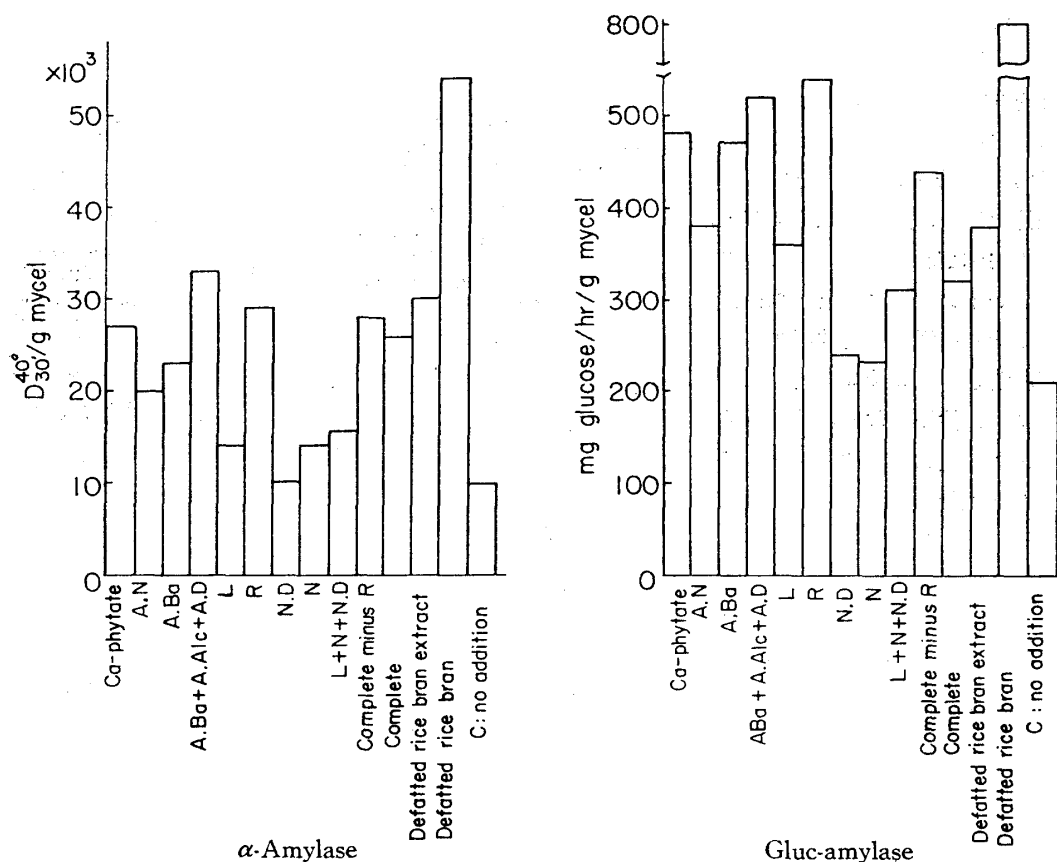


Fig. 1-A. Effect of each phosphate fraction from rice bran extract upon enzyme formation in the submerged culture of *Asp. cryzae* Un-3.

Incubation condition: Total volume in 100ml flask, 25ml (contained pH 5.2 McIlvaine buffer 5ml); initial mycelia, ca. 60mg dry wt.; temperature, 31°C; period, 42 hr.

Medium composition: Soluble starch, 5%; monosodium glutamate, 0.8%; NaNO₃, 0.24%; KH₂PO₄, 0.16%; MgSO₄·7H₂O, 0.04%; each phosphate fraction (proportional to 2% rice bran).

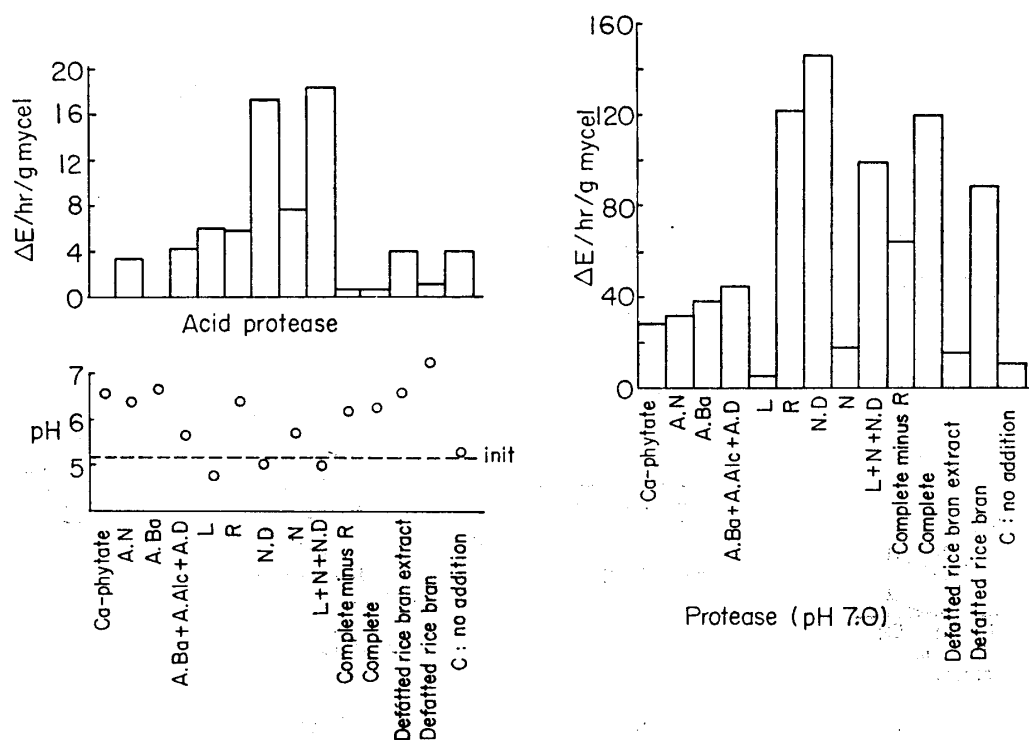


Fig. 1-B. Effect of each phosphate fraction from rice bran extract upon enzyme formation in the submerged culture of *Asp. oryzae* Un-3.

米粉 6%, 脱脂米糠 2%抽出液, NaNO_3 0.3%, KH_2PO_4 0.2%, 100 mesh セルローズパウダー 3%, 培養温度 30°C) 43時間後の洗浄菌体を全量 300ml の殺菌水に懸濁し, 内 5ml を各使用フラスコに分注して実験を行った (5ml 中乾燥重量は計算にて 180mg, 内真正菌体量は約 60mg である)。使用フラスコは 100ml 容三角フラスコを用い, 全液量は 25ml とする (本培地組成は実験方法でのべた基本培地組成の各 2 割減とし, 分画製品は脱脂米糠のものを使用し, それぞれ糠 2%相当量を加える。また pH 5.2 McIlvaine 緩衝液 5ml を含む)。培養温度 31°C 42時間培養後, 培養液中の各酵素力価を測定し, 培養中に増加した菌体 1g 当りの増加酵素活性を求めた (Fig. 1-A, Fig. 1-B)。

Amylase に対しては酸可溶区分 (A.N., A.Ba, A.Ba+A.Alc.+A.D.) が脱脂糠抽出液の添加効果に, ほぼ匹敵する効果を示し, 他の L, N, N.D. 区分などは効果なく無添加のコントロールと等しい。ただし脂質区分 L はつぎに示す時間経過を調べた場合にはいずれも有効な結果となり一定しなかった。残渣区分 R もまた添加効果を示した。しかし脱脂糠をそのまま添加して培養した場合が一番酵素生産量多く, 分画製品を全て合わせて添加しても (complete) それだけの効果を示さなかった。

Protease に対しては pH の関連と共にとくに N.D. 区分が効果的である。この区分にはアミノ態 N などが含まれており protease 生産に有利なものと考えられる。

つぎに米糠および脱脂米糠分画製品を添加して, 各酵素生成の時間経過を調べた。米糠の場合の基本培地組成は実験方法と同じであり, 脱脂米糠の場合は本培地にグルタミン酸ソーダの代わりにミルクカゼイン (Hammers-ten 氏法) を 1%加えた。緩衝液は最終濃度として pH 5.0 の McIlvaine 緩衝液を用いた。用いた容器は 500 ml 容三角フラスコ, 液量 100ml である。

この結果 Fig. 2-A, Fig. 2-B に示すように, ほぼ前実験と同様な結果を示したが, この実験では脂質区分の添加が amylase, protease (pH 7.0) に対し有効な結果となった。しかしいずれにしても酸可溶区分, 残渣区分は amylase 生成に有効であるが, 核酸, 核溶区分などは大して効果なく, また protease では核溶区分が有効成分としてとり上げられる。

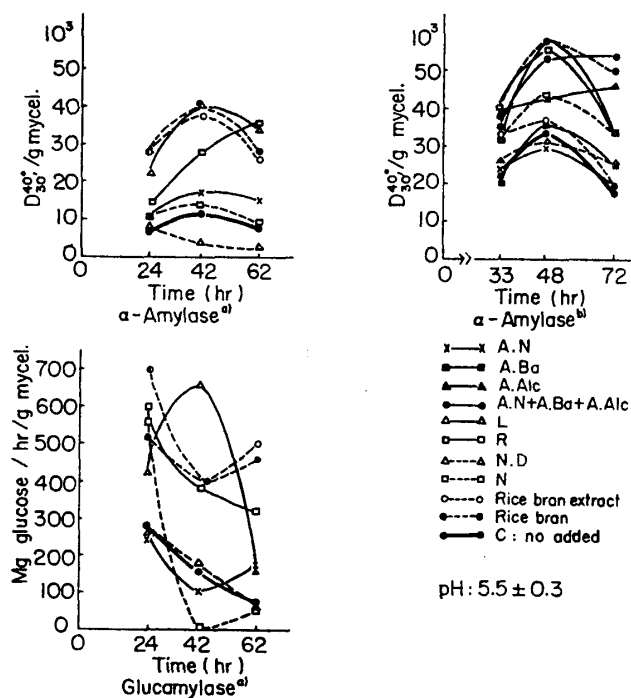


Fig. 2-A. Time course of enzyme formation in the submerged fungal culture added initially with each phosphate fraction from rice bran extract.

Incubation condition: Total volume in 500ml flask, 100ml (pH 5.0 McIlvaine buffer); temperature, 31°C.

Medium composition:

- a) Soluble starch, 6%
 Monosodium glutamate, 1%
 NaNO_3 , 0.3%
 KH_2PO_4 , 0.2%
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%
 Phosphate fraction
 (proportional to 2% rice bran)

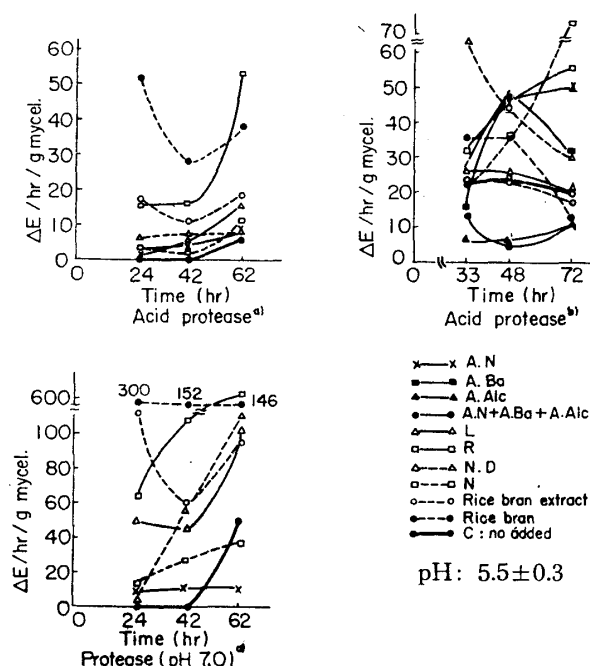


Fig. 2-B. Time course of enzyme formation in the submerged fungal culture added initially with each phosphate fraction from rice bran extract.

- b) Soluble starch, 6%
 Milk casein, 1%
 NaNO_3 , 0.3%
 KH_2PO_4 , 0.2%
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%
 Phosphate fraction
 (proportional to 2% defatted rice bran)

II. 酸可溶区分とくに phytin の添加効果 実験 I において有効と認めたもののうち、とくに酸可溶区分についてさらに検討を加えた。まず抽出手段を HCl 抽出に変え、10倍量の HCl との煮沸抽出 (1.5時間) および振盪抽出 3時間を行なって得た抽出液について添加効果を調べる。同時に抽出液を KOH 中和後10分間煮沸によって得た沈澱物 (3回水洗) および上澄の添加効果試験を行なった。中和沈澱物には不純物も存在するが、糠中には約 1% の phytin 態リンが存在していることより、その多くは phytin と考えられる (KOH 中和にて得た沈澱の3回水洗後の乾燥重量は脱脂米糠 10g より 2% HCl 煮沸抽出の場合 1.4g, 同振盪抽出 1.0g, 0.2% HCl 煮沸抽出 0.59g, 同振盪抽出 0.74g であった)。したがって市販 phytin 製品も同時に添加試験を行なった。培地組成は米粉 6%, 乳酸アンモン 0.1%, Urea 0.1%, NaNO_3 0.2%, KH_2PO_4 0.2% であり糠抽出物は 2%相当量を添加した。Fig. 3 にその結果を示す。HCl 抽出操作間においては、いずれも同様な傾向を示し、抽出混液の添加はとくに著しい α -amylase の生産を増加し、さらにその効果は中和沈澱物の区分にあることがわかる。また市販 phytin (Ca-ph.) を添加した場合も有効であった。これと同様な効果は acid protease において認められるが, glucamylase には差が認められなく、また protease (pH 7.0) は一定した傾向が認められなかった。

つぎに中和区分の主体と考えられる phytin をとりあげ、その添和による各酵素の時間経過 (Fig. 4) およびその添加量の効果 (Fig. 5) を検討した。Phytin の添加は α -amylase に対し有効であり、脱脂糠を培地より除

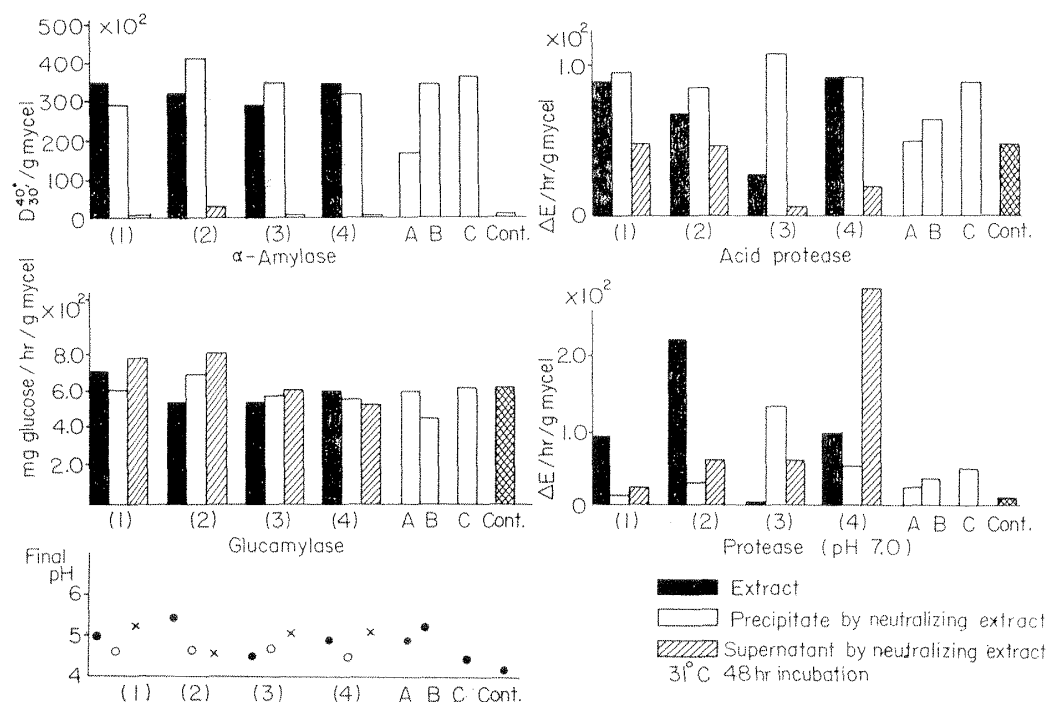


Fig. 3. Effect of acid soluble fraction from defatted rice bran extract upon enzyme formation in the submerged fungal culture.

Medium composition: *cf.* Fig. 5 except rice bran extract

Extract condition for defatted rice bran

(1): 0.2% HCl (boiling) (2): 2% HCl (boiling)

(3): 0.2% HCl (shaking) (4): 2% HCl (shaking)

A: Defatted rice bran extract,

B: Defatted rice bran extract+Ca-phytate

C: 0.2% Calcium phytate,

Cont.: Control exp. without addition.

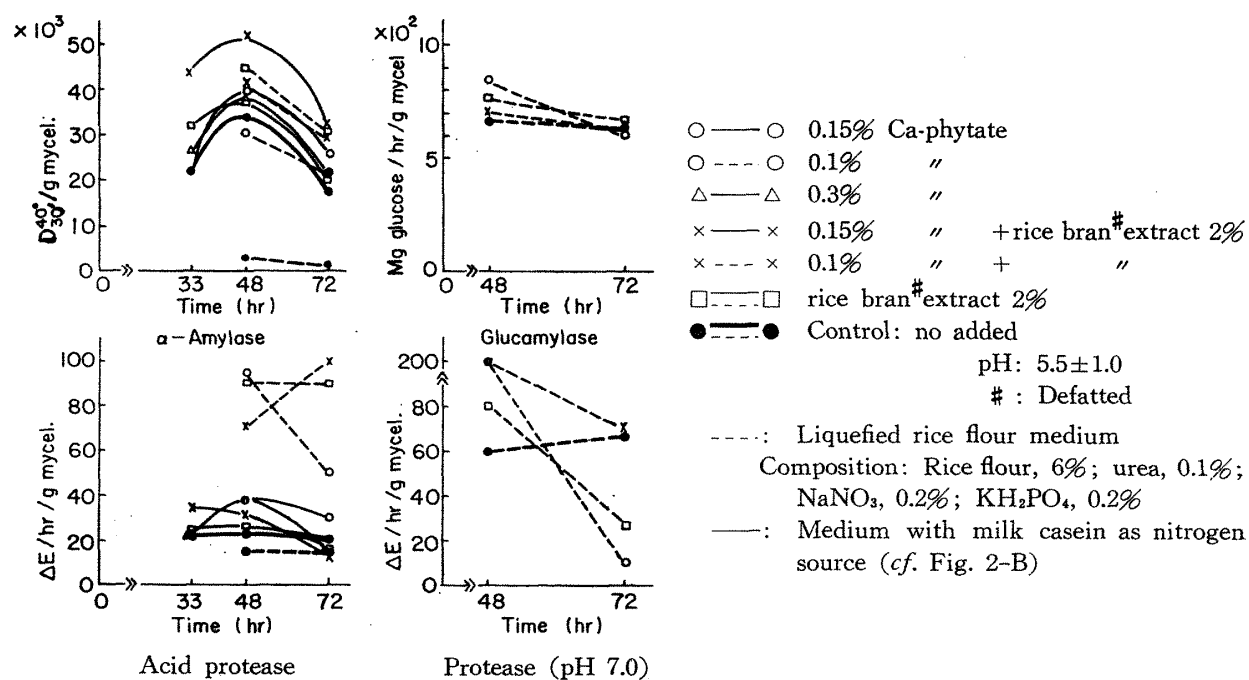


Fig. 4. Time course of enzyme formation in the submerged fungal culture added with calcium phytate.

いた場合効果が大きい。他の酵素については Fig. 3 と同じく Fig. 4, 5 において acid protease にその添加効果が認められる。添加量については 0.1% の添加でも十分である。 α -amylase に対する phytin の添加効果は Dunn ら⁵⁾が *Asp. niger* に対し、寺本ら⁶⁾が *Asp. oryzae* の培養に対して認めており、それがどのようなメカニズムで有効に作用するかを知る目的でつぎに実験を行なった。

Ⅲ. 菌体内 α -amylase の放出に対する Ca-phytate の効果 麹菌の生産する α -amylase は菌体内外に認められ、Tonomura ら⁷⁾は、その内、菌体内 α -amylase が細胞表面に存在しており、その離脱はリン酸濃度 (M/20 以上), pH (pH 7.2 以上) およびリンペプチッドによって促進されることを報告している。

ここで問題としている phytin の培養における添加効果も、これと類似の現象にあることも考えられ、私達の培養条件において同様の実験を行なった。

菌体は *Asp. oryzae* Un-3 を 500ml 容三角フラスコにて前培養 (実容 100ml; 培地組成: 実験方法と同じ, ただし可溶性デンプンを 4% とする; 30°C, 50 時間) し、その菌体を吸引濾過にて集め、蒸留水にて 3 回 (100ml, 50ml, 50ml) 水洗冷却して用いる (wet wt. 27.3g; dry wt. にて 6.55g, セルロース粉末重量を引いた真正菌体量は約 3.8g)。

洗浄菌体は Scheme 2 の手順に従って超音波破壊後、その溶出部と残渣 (粗細胞壁区分) とに分離し、これらに Ca-phytate 溶液などの検査物質を添加、一定時間抽出した後、その上澄の酵素活性を測定した。その結果を Table 1 に示す。前培養濾液 (No. 8) すなわち菌体外酵素活性はほとんどないにかかわらず菌体内とくに粗細胞壁区分に α -amylase 活性が存在し、

外村らの離脱条件——M/20 リン酸緩衝液 pH 7.55 や 1% NaCl によって抽出液中に α -amylase が離脱してくる。Table 1 にみられるように Ca-phytate soln を添加した場合 (実験 No. 3, 4) もそれらと同程度の活性が抽出上澄に認められ、pH 5 においても十分効果があった。またそれらは時間的にかなりすみやかである。一方蒸留水抽出および超音波破壊上澄に対してリン酸緩衝液や Ca-phytate を添加しても全く効果はなかった。

このような結果は Ca-phytate の添加効果が少なくとも内生 α -amylase (細胞壁に存在していると考えられている) の細胞壁よりの離脱にあると考えられる。なお用いた Ca-phytate soln 中に含まれるリン酸濃度は 1 μ mole/ml 以下とかなり低く、離脱効果は少なくとも溶液中に含まれる無機リン酸イオンによるものではない。

つぎに生菌を用いてその効果を調べてみた。Table 2 のごとく洗浄菌体より抽出した結果は、細胞破壊のデータ (Table 1, Table 2 No. 8) と比べリン酸緩衝液の抽出効果が劣っている。しかし Ca-phytate の効果は破壊の場合と変わらず生菌の場合でも、破壊の場合でも両者に差が認められない (No. 5, No. 8)。しかも活性は時間と共に幾分増加するが、その大半は短時間に検出され、かつ 2° と 30°C との温度間差も大きくはない (No. 1 と No. 4, No. 2 と No. 5)。

しかし Ca-phytate の α -amylase 放出効果にはリンペプチッドの場合のようなリン酸基の放出は認めうるだけの増加が得られなかった。

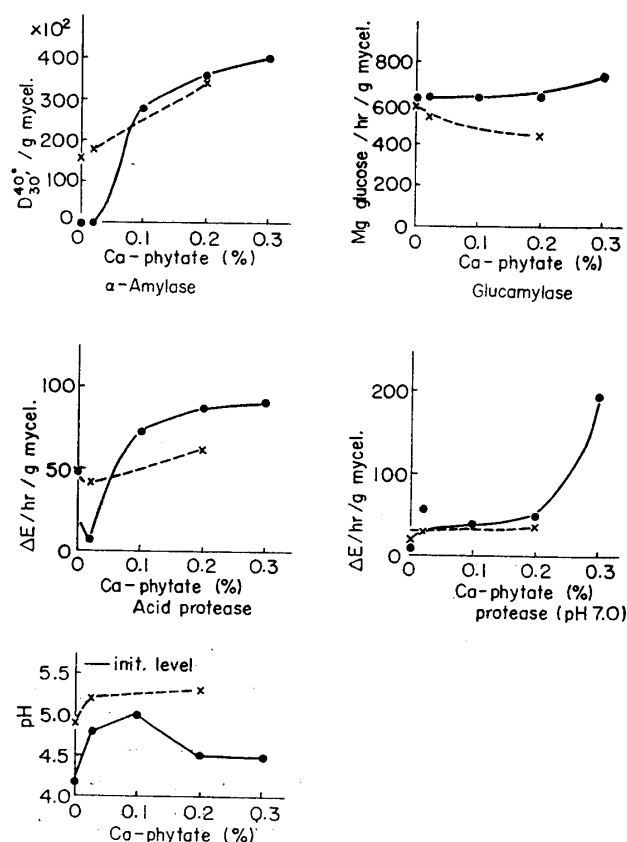


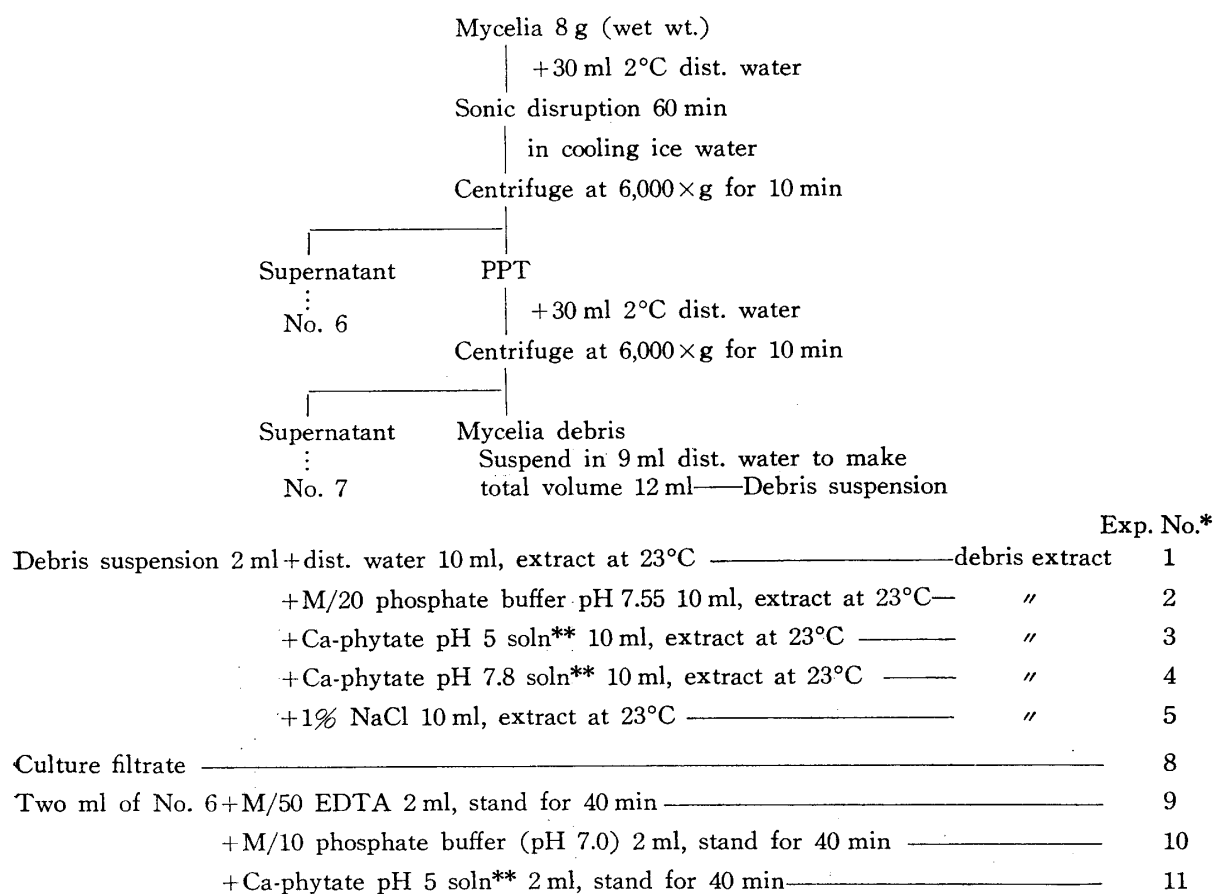
Fig. 5. Dependence of enzyme formation upon the initial content of calcium phytate in the medium.

Medium composition (%)

Rice flour	6	6
Rice bran [#] (extract)	—	2
Ammonium lactate	0.1	0.1
Urea	0.1	0.1
NaNO ₃	0.2	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2	0.2

31°C 48 hr incubation

[#]: Defatted

Scheme 2. Treatment of mycelia and mycelia debris for extracting α -amylase.

*...In No. 1-11, 6,000×g supernatants were used for α -amylase estimation.

**...Calcium phytate solution; pH 5 soln (total P, 4.8 μ mole/ml; direct P, 0.96 μ mole/ml), pH 7.8 soln (total P, 4.8 μ mole/ml; direct P, 0.33 μ mole/ml).

Table 1. Activity of α -amylase in mycelia extracts obtained by the procedure linked in Scheme 2.

No.	Extraction time (min)	pH	α -Amylase (U/ml)	"Direct" phosphate by method of Fiske-Subbarow ³⁾ (μ mole/ml)
1	10	(6.2)	0	0.044
	40		0	0.06
2	10	7.5	16.6	
	40	7.5	17.6	
3	10	5	15.8	0.96
	40	5	17.6	0.98
4	10	6.9	13.6	0.31
	40	7.3	15	0.34
5	10	6.3	12.3	
	40	6.5	12.5	
6		(5.7)	3.8	0.87
7			0	
8		6.2	0	9.0
9			1.6	
10			1.6	
11			1.7	

Table 2. Extraction of α -amylase directly from mycelia.

Methods of extraction were as follows.

Asp. oryzae

Mycelia 2 g + M/20 Phosphate buffer 20 ml	extract	No.*
+ Ca-phytate pH 5 soln 20 ml	at 2°C	1
+ Dist. water 20 ml		2
+ M/20 Phosphate buffer 20 ml	extract	3
+ Ca-phytate pH 5 soln 20 ml	at 30°C	4
Culture filtrate		5
Sonic extract		6
Disrupted mycelia + Ca-phytate pH 5 soln, then extracted at 30°C for 1 hr		7
No. 7 + Ca-phytate pH 5 soln		8
		9

No.	Extraction time (min)	α -Amylase (U/ml)	"Direct" phosphate by method of Fiske-Subbarow ³⁾ (μ mole/ml)
1	15	2.1	
	30	1.9	
	60	2.0	
	150	2.3	
2	15	6	0.93
	30	6.8	1.02
	60	7.5	1.02
	150	8.3	1.04
3	15		0.12
	30		0.14
	60	0	0.15
	150	0	0.18
4	15	2.5	
	30	2.8	
	60	2.8	
	150	3.5	
5	15	7.5	0.97
	30	8.8	1.08
	60	11	
	150	10	1.08
6	(pH 6.2)	0	8.4
7		0.4	
8		12.5	0.96
9		0	

*...Extracts from No. 1 to 5 were obtained by filtration, and No. 8 by centrifugation at 6,000 $\times$ g.

ついて菌体を置換し温度 30° にて培養した場合の結果を Table 3 に示す。上欄は炭素源、窒素源なしで振盪した場合、下欄は グルコース 2%, NaNO₃ 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02% の培地組成にて培養した場合である。炭素源、窒素源なしの場合、振盪 6 時間後 phytin を添加したものはいずれも α -amylase の活性が認められるが、イノシトール、リン酸カリ (0.3%), Ca⁺⁺, ATP および無添加のものではいずれも活性はほとんど認められない。また培養 12 時間後においては phytin を添加したものは、その増加はあまりなく 6 時間で大半を放出していることがわかる。他の添加物質のものは 12 時間後にて活性が認められるが、同時に無添加のものでも認められ、これは菌体のオートリシス、pH の上昇 (pH 8) による放出と考えられ、phytin 以外のものの添加による直接的効果とは認めがたい。とくに下欄の炭素源、窒素源添加による培養では Ca-phytate 以外のものでは活性は 12 時間後においても認められない。

これらの結果より、Ca-phytate が細胞増殖に対する効果も有していると考えられるが、酵素産生、とくに α -amylase にかんしては菌体外への放出に、それが直接的に影響をもつものと考えられ、その構成成分も phytin 態として初めて効果をもっており、Ca⁺⁺, リン酸イオン、イノシトールではこれに相当する効果をもち得ないことがわかった。

Table 3. Effect of Ca-phytate and related substances upon the liberation of α -amylase from mycelia in non-growing (No. 1—9) and growing (No. 10—14) conditions.

Mycelia suspensions were shaken at 33°C.

Run No.		Suspending medium	pH		α -Amylase ($D_{30}^{40^\circ}/\text{ml}$)	
			6 hrs	12 hrs	6 hrs	12 hrs
1	Distilled water plus	Ca-phytate 0.1%	7.3	8.3	60	75
2		Ca-phytate 0.3%	7.7	8.1	25	50
3		A.N. fraction in scheme 1	7.2	8.0	50	75
4		Precipitate in Fig. 3 0.2%	7.6	8.1	60	90
5		Inositol 0.3%	7.6	7.8	0	38
6		Inositol 0.3% plus KH_2PO_4 0.3%	7.1	7.4	2	33
7		$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2%	7.6	8.1	3	66
8		ATP 2 mg %	7.6	8.2	0	60
9		No added	7.1	8.3	3	75
10	Medium* plus	Ca-phytate 0.3%	6.7	6.1	30	82
11		Inositol 0.3%	6.1	6.3	0	0
12		$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2%	5.5	7.0	0	0
13		ATP 2 mg %	6.8	6.2	0	0
14		No added	6.9	6.5	0	0

*...Glucose, 2%; NaNO_3 , 0.3%; KH_2PO_4 0.1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02%Strain: *Asp. oryzae* Un-3

Mycelia used in these experiments were grown for 55 hr at 33°C in the growth medium of the following composition: soluble starch, 4%; MSG, 1%; NaNO_3 , 0.3%; KH_2PO_4 , 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; cellulose powder, 3%

Alpha-amylase activity in the 55 hr culture filtrate (pH 6) was undetectable.

要 約

1. 米糠のリン酸分画製品を培地に添加して酵素生産への効果を調べた結果, amylase に対しては, 酸可溶区分, 残渣区分, (脂質区分) などが有効であり, protease に対しては, とくに核溶区分が効果的であった。
2. 米糠を塩酸抽出した場合, 抽出液および抽出液の KOH 中和沈澱区分の培地中添加は, α -amylase, acid protease 生産に有効であり, glucamylase, protease (pH 7.0) には有意な差がみられなかった。
3. 塩酸抽出中和沈澱区分の主体は phytin 様物質と考えられ, とくに phytin について, その添加効果を調べると α -amylase 生産に対して大きな効果が認められ, 他に acid protease 生産にも有効なことがわかった。Phytin 添加量については 0.1%程度の添加で十分な効果がみられる。
4. α -Amylase は培養条件によっては, そのほとんどが菌体より外に出ず, それらは主として細胞壁に存在していると認められているが, Ca-phytate の α -amylase 生成に対する効果は, 一つにその離脱にあることがわかった。
5. 細胞を破壊し粗細胞壁区分に対し弱酸性で Ca-phytate を添加すると α -amylase がすみやかに抽出されてくる。生菌を用いた場合でも Ca-phytate によってかなり速やかに液中に抽出され, かつそれらの温度効果はきわめて低い。
6. Ca-phytate の構成成分であるイノシトール, リン酸, Ca イオン各単独では上のような効果は認められなかった。また ATP も phytin のような低濃度での効果は見出されない。

本研究の主体は1963年度日本農芸化学大会において講演した。

文 献

- 1) 日本化学会：実験化学講座, **23**, 285, 第2版
丸善 K. K. (1963).
- 2) 日本化学会: *ibid*, **23**, 538 (1963),
Le Page, G. A., in Umbreit, W. W.: "Mano-
metric Techniques", 268 (1957).
- 3) Fiske, C. H., Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*,
66, 375 (1925).
- 4) 森, 渡辺: 本誌, **31**, 419, 421 (1953); **32**, 421
(1954); **34**, 530 (1956).
- 5) Dunn, C. G., Fuld, G. J., Yamada, K., J. Mas
Urioste, Casey, P. R.: *Appl. Microbiol.*, **7**,
212 (1959).
- 6) 寺本, 渡辺: 未発表 (渡辺秋衛氏大阪大学工学部
卒業研究)
- 7) 三吉, 照井: 本誌, **43**, 311 (1965).
- 8) Tonomura, K., Futai, F., Tanabe, O.: *Agr.*
Biol. Chem., **26**, 10, 434 (1962), **27**, 128 (1963).
(昭 41. 6. 27 受付)