Trichoderma viride の生産するグルコアミラーゼに関する研究

岡田 厳太郎*

(昭和52年9月17日受理)

Glucoamylase from *Trichoderma viride*

Gentaro OKADA*

* Department of Biology, Faculty of Education, Shizuoka University
(836, Oya, Shizuoka-shi, Japan)

The major amylolytic enzyme present in Meicelase, a commercial crude cellulase preparation from *Trichoderma viride*, was purified by consecutive column chromatography, and characterized as a glucoamylase [EC 3.2.1.3]. The specific activity was brought to 18.3 units of soluble starch-saccharifying activity/mg of enzyme protein, and the enzyme showed a single band on polyacrylamide gel disc electrophoresis.

Some properties of the purified glucoamylase were investigated. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 75,000 on the basis of SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and the optimum temperature for the activity of the enzyme were pH 5.0—5.5 and 60°C, respectively. The enzyme was stable over the range pH 5.0—7.0 at 4°C and was completely inactivated by heating at 90°C for 10 min. Hg^{2+} completely inhibited the enzyme, but other metal ions tested had little effect on the activity at the concentration of ions used (1 mM).

The action of the enzyme on glycogen, amylopectin, soluble starch, short chain amylose (DP=17.3), maltose, isomaltose and panose was studied. Glucose was the sole hydrolysis product found in digests of these substrates. At the same substrate concentration (0.075%, w/v) and enzyme concentration, the relative initial rates of glucose production from amylopectin, soluble starch, short chain amylose and maltose were about in the proportions 8:8:8:1. The K_m and V_{max} values at 30°C and pH 5.0 were calculated for the enzyme acting on glycogen, amylopectin, amylose, soluble starch, short chain amylose and maltose.

By using the authentic anomers of D-glucopyranose under conditions limiting mutarotation, it was found that the condensation reactions catalyzed by glucoamylase require a donor substrate of specific configuration.

The purified enzyme, which hydrolyzes amylaceous substrates to β -D-glucopyranose, was found to catalyze the rapid synthesis of maltose and isomaltose specifically from β -D-glucopyranose. The configurational inversion accompanying the condensations indicates that the D-glucopyranosyl portion of β -D-glucopyranose is interchanged with hydrogen at the C₄ or C₆ carbinol site of a second D-glucose molecule (glucosyl transfer).

* 静岡大学教育学部生物学教室 (422 静岡市大谷836)

このたびは日本澱粉学会より奨励賞を受賞いたしました、まことに名誉なことと存じております。

私は十数年前より、糸状菌 *Trichoderma viride* のセルラーゼ系の解析を手がけてまいりましたが、その間この菌が強力な糖化型アミラーゼを生産することを見出しました¹⁾。本菌の生産するセルラーゼ系を解明するためには、まず各セルラーゼ成分の純化精製が必須であります。このアミラーゼは各種カラムクロマトグラフィーにおいて、セルラーゼの1成分と挙動をともにし、セルラーゼ精製上なかなかやっかいな存在でありました。そこで、このセルラーゼ成分とアミラーゼとを相互に収率よく分離することから、本研究は開始されたといえます。

ただいまから、この糖化型アミラーゼについて、これまでに得られた知見を総合してお話し申し上げようと思います。なお本研究の詳細は、すでに澱粉科学誌上に発表いたしました²⁻⁴⁾。

I. 酵素の精製

Trichoderma viride をフスマ固型培養し、そのイソプロパノール沈殿物である市販粗セルラーゼ標品 (Mei-celase) の水抽出液を十分透析後、凍結乾燥し、酵素精製の出発材料とした。この凍結乾燥標品を Amberlite CG-50 のカラムにかけ、酢酸緩衝液の pH および塩濃度を同時に上昇させる段階溶出法により、アミラーゼ活性に富むいわゆる Peak II 画分 (0.3 M, pH 4.5 溶出画分)¹⁾ を得た。次に、この Peak II 凍結乾燥標品を DEAE-Sephadex A-50 のカラムにかけ、酢酸緩衝液

(pH 4.0) の塩濃度を段階的に上昇させることにより、アミラーゼ活性とセルラーゼ活性に富むいわゆる F II 画分 (0.2 M 溶出画分)¹⁾ を得た。ひきつづき、この F II 画分を条件を変えた DEAE-Sephadex A-50 のカラムにかけ、共存する大部分のセルラーゼ画分 (A 画分) とアミラーゼ画分 (B 画分) とを分離した (Fig. 1)。得られた B 画分を Sephadex G-75 のゲルろ過、Sephadex G-75 の再ゲルろ過にかけ、共存するセルラーゼを除去した (Fig. 2)。このようにして得られたアミラーゼ標品は、ポリアクリルアミドのディスク電気泳動で単一バンドを与えたので、これを最終精製酵素標品とした。

酵素反応は通常 30°C で行ない、酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用い、可溶性澱粉 (終濃 0.075%) に酵素を作用させ、1 分間に 1 μ mole のグルコースを生成する酵素量を 1 単位とした。Table 1 に示されているように、この精製標品は 1mg あたり 18.3 国際酵素単位を与え、Peak II 凍結乾燥標品を基準にすると、精製の最終段階で活性の回収率は約 5% であり、比活性は約 42 倍上昇した。

II. 酵素の基本的な性質

1) 分子量

精製酵素の分子量を cytochrome c (mol. wt. 12,400), myoglobin (mol. wt. 17,000), ovalbumin (mol. wt. 45,000), BSA (mol. wt. 67,000) を標準タンパク質として、SDS ポリアクリルアミド・ディスク電気泳動法で求めたところ、その分子量は約 75,000 と推定された (Fig. 3)。

Fig. 1. Elution patterns of F II on DEAE-Sephadex A-50 column chromatography.

● total protein (E_{280}), ▲ amylase activity (E_{660}), ○ cellulase activity (E_{660})

Fig. 2. Gel filtration of Peak B on Sephadex G-75.

● total protein (E_{280}), ▲ amylase activity (E_{660}), ○ cellulase activity (E_{660}).

Table 1. Recoveries and activities of amylase in the course of purification.

Step of purification	Vol. (ml)	Protein (mg)	Activity		
			Units	Yield (%)	Sp. activity (units/mg)
1. Lyophilized powder (Peak II)	50	1000.0	437.0	100	0.44
2. 1st DEAE-Sephadex A-50	958	155.2	84.7	19.4	0.55
3. 2nd DEAE-Sephadex A-50	158	30.9	63.2	14.5	2.05
4. 1st Sephadex G-75	60	1.8	32.0	7.3	17.78
5. 2nd Sephadex G-75	60	1.2	22.0	5.0	18.33

2) 至適 pH

本酵素の作用至適 pH を、各種 pH の酢酸緩衝液 (0.05 M) および McIlvaine 緩衝液 (0.05 M) を用いて検討したところ、いずれの緩衝液においても、pH 5.0～5.5 付近にその反応最大値を認めた。

3) 反応最適温度

pH 5.0 で 30℃ から 10 度間隔の各温度で、各 10 分間ずつ酵素反応を行なった結果、本酵素は 60℃ で最大活性を示した。

4) pH 安定性

各種 pH の McIlvaine 緩衝液 (0.02 M) を用いて、4℃ で 24 時間および 45℃ で 2 時間本酵素を処理し、その残存活性を測定した。その結果、4℃、24 時間処理では pH 5.0～7.0 の領域で本酵素は安定であったが、45℃、2 時間処理では pH 5.0～5.5 付近が最も安定であ

り、pH 7.0 以上では完全に失活した。

5) 熱安定性

pH 5.0 で本酵素を 30℃ から 10 度間隔の各温度で 10 分間加熱処理し、その残存活性を測定した。その結果、30～40℃ の処理ではほとんど活性の低下は認められなかったが、50℃ 以上の処理ではその活性は急激に低下した。すなわち、残存活性は 50℃ で 80%、60℃ で 40%、70℃ で 7% 程度を示し、90℃ 以上では完全に失活した。

6) 各種試薬の阻害効果

各種金属イオン (終濃 1 mM) ならびに阻害剤 (終濃 0.1 mM) が、この酵素の活性におよぼす影響について調べた。本酵素を上記濃度の各試薬中で 30℃、10 分間処理し、その残存活性を測定し、それぞれ比較した。金属イオンの影響としては、 Hg^{2+} で完全にその活性がおさえられたが、他の金属イオンではほとんど阻害効果はな

Fig. 3. Estimation of the molecular weight of the purified enzyme by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

Proteins used as standards; 1: cytochrome c, 2: myoglobin, 3: ovalbumin, 4: bovine serum albumin, 5: a purified glucoamylase preparation.

Table 2. Observed optical rotation during the hydrolysis of soluble starch by *T. viride* glucoamylase. Final concentration of the substrate, 4.5%; the enzyme solution, 2.0 ml (4 units); reaction temperature, 22–23°C.

Time	Optical rotation		
	before mutarotation α_D	after mutarotation α'_D	mutarotation $\alpha'_D - \alpha_D$
	angular degree		
10 min	+18.26	+18.31	+0.05
30 min	+18.25	+13.33	+0.08
60 min	+18.17	+18.32	+0.15

かった。その他の試薬の影響としては、過マンガン酸カリにより若干阻害されたが、PCMB, EDTA, モノヨード酢酸等によっては、ほとんど影響を受けなかった。

III. 酵素の作用様式

1) 各種基質から得られる反応生成物

本酵素を各種澱粉性基質（グリコーゲン、アミロペクチン、アミロース、可溶性澱粉、短鎖アミロース等）に作用させ、経時的にその反応生成物をペーパークロマト

グラフィーで追跡したところ、反応初期からその生成物はグルコースのみであった。本酵素はマルトースに比較的良好に作用し、また微弱ではあるが、イソマルトースにも作用した。さらに、パノースにも良好に作用した。まず、この基質の α -1,6 グルコシド結合が、ついで α -1,4 グルコシド結合が切断され、最終的にグルコースのみが得られた。また、本酵素を比較的高濃度のマルトース溶液（終濃 2%）に作用させても、転移生成物は検出されなかった。

2) 反応生成物の configuration の決定

不破・二国の方法⁵⁾に従って本酵素を終濃 4.5% の可溶性澱粉に作用させ、その反応生成物の与える旋光度を観測した。得られた結果は Table 2 に示されており、反応時間の経過とともに、生成物の変旋光値は正の値を示した。このことは、本酵素による反応生成物が β -configuration であることを示唆している。この事実と前述の各種澱粉性基質から得られた生成物が、すべてグルコースであること、および従来報告されてきた他の起源のグルコアミラーゼに関する知見等を総合して、本酵素はいわゆるグルコアミラーゼ [EC 3.2.1.3] であると考えられた。

3) 各種澱粉性基質に対する分解限度

本酵素をグリコーゲン、アミロペクチン、可溶性澱粉、短鎖アミロース (DP=17.3) 等に作用させ、経時的にその分解率を求めたところ、これらの基質をそれぞれほぼ完全に分解することを認めた (Fig. 4 および Fig. 5)。この事実は、本酵素が *Rhizopus delemere* 型^{6,7)}のグルコアミラーゼであることを示唆している。また同一基質濃度（終濃 0.075%）ならびに同一酵素濃度を用いて、本酵素をアミロペクチン、可溶性澱粉、短鎖アミロースおよびマルトースに作用させたところ、そのグルコース生成の反応初速度の相対比は、ほぼ 8:8:8:1 であった。

4) 各種澱粉性基質に対する K_m ならびに V_{max} 値

本酵素を各種澱粉性基質に作用させ、それぞれに対する K_m 値ならびに V_{max} 値を求めた。Table 3 に、本酵素および他の微生物起源のグルコアミラーゼから得られた K_m 値がまとめられているが、本酵素のグリコーゲン、アミロペクチン、アミロース、可溶性澱粉、短鎖アミロースに対する K_m 値は、ほぼ同様の値を示した。また本酵素は、他の微生物起源のグルコアミラーゼ⁸⁻¹⁰⁾に比較して、これらの澱粉性基質に対してかなり高い親和力を示した。本酵素はアミロース、可溶性澱粉、短鎖アミロースに作用してほぼ同程度の V_{max} 値を与えたが、グリコーゲン、アミロペクチンのような分枝構造を

Fig. 4. Percentage conversion of soluble starch into glucose.

○ NAKARAI soluble starch,
● MERCK soluble starch.

Fig. 5. Percentage conversion of glycogen, amylopectin and short chain amylose (DP=17.3) into glucose.

△ glycogen, ○ amylopectin,
● short chain amylose.

Table 3. A summary of K_m values of glucoamylases from different microorganisms.

Substrate	Enzyme source			
	<i>Trichoderma viride</i> (%)	<i>Coniophora cerebella</i> ⁸⁾ (%)	<i>Rhizopus delemar</i> ⁹⁾ (%)	<i>Mucor rouxianus</i> ¹⁰⁾ (%)
Maltose	1.5×10^{-1}	6.3×10^{-1}	2.3×10^{-1}	
Short chain amylose	2.8×10^{-3}			
Soluble starch	2.9×10^{-3}			
Amylose	2.9×10^{-3}	4.2×10^{-1}	5.8×10^{-1}	I) 4.6×10^{-2} II) 2.9×10^{-2}
Amylopectin	1.9×10^{-3}	3.4×10^{-2}	6.2×10^{-2}	I) 7.4×10^{-2} II) 6.7×10^{-2}
Glycogen	2.5×10^{-3}			I) 1.1×10^{-1} II) 1.5×10^{-1}

有する基質に対しては、アミロース等で得られた値よりもやや高い V_{max} 値が得られた (Table 4).

IV. 逆合成作用の反応機構

グルコアミラーゼの逆合成作用に関して、従来は高濃度の化学的に単一でない異性体の混合物である D-グルコースがその基質として用いられ、非常に長時間の酵素反応後の主生成物として、イソマルトースの合成が報告されてきた。

本研究では、従来とは異なるアプローチとして、この酵素の縮合作用の donor として、グルコースの精製結

晶 α -および β -アノマーをそれぞれ別個に用い、極度に短時間の酵素反応を行なわせることによって反応中に生ずる基質の変旋光を限定し、興味ある結果を得た。

80 μ l のグルコアミラーゼ溶液 (タンパク量として 0.4 mg に相当) を、30mg の結晶 β -D-グルコース (終濃 30%) に 30°C で 2, 6, 15 分間それぞれ作用させたときに得られた反応生成物のペーパークロマトグラムが Fig. 6 の左側のシリーズで、同量の酵素を 30mg の結晶 α -D-グルコースに全く同じ条件下で作用させたときの反応生成物のクロマトグラムが右側のシリーズである。対照には、グルコースの各アノマーに熱失活させた同量の酵素

Table 4. $V_{\max}$ values of purified glucoamylase from *T. viride* for various substrates. The values were calculated from LINEWEAVER-BURK plots.

Substrate	$V_{\max}$ (μ moles glucose/min/mg protein)
Maltose	4.2
Short chain amylose	9.5
Soluble starch	10.4
Amylose	9.9
Amylopectin	13.3
Glycogen	14.0

Fig. 6. Pairs of stained chromatograms from mixtures of a highly purified glucoamylase (GAm) incubated with β - or α -D-glucopyranose at 30°C for 2, 6, or 15 min, and from controls of the inactivated enzyme (Δ GAm) plus the β - or α -D-glucose.

(図中の Δ GAm) を加えたものを用いた。Fig. 6 から明らかなように、本グルコアミラーゼは β -D-グルコースに特異的に作用して、非常に短時間で実際に分離可能な量のマルトース、イソマルトース（これらの同定に関しては後述）を合成することが判明した。この事実は、HEHRE¹¹⁾によって *Rhizopus niveus* のグルコアミラーゼで得られた結果と一致している。

これら2種の反応生成物を展開後のろ紙より別個に溶出し、マーカーの各種 α -グルコビオースとともにペーパークロマトグラフィーを行なったところ、それぞれマーカーのマルトース、イソマルトースの移動位置と一致し、さらにこれらの生成物に *Candida tropicalis* の α -

Fig. 7. α -Glucobioses (maltose plus isomaltose) formed by action of purified glucoamylase from 30 mg of initially pure β -D-glucopyranose (—●—) or 30 mg of initially pure α -D-glucopyranose (—○—).

Determinations, made on eluates from maltose and isomaltose sections of chromatograms, were corrected for background carbohydrate in corresponding sections of chromatograms of mixtures with inactivated enzyme plus α - or β -D-glucose. Content of β -glucose in the mixtures (-----) with time was estimated from the mutarotation coefficient for D-glucose at 30°C.

グルコシダーゼを別個に作用させると、それぞれ完全に加水分解され、グルコースのみが得られた。従って、この2種の生成物の結合部位の configuration は、いずれも α 型であることが判明した。これらの事実から、2種の生成物はそれぞれマルトースおよびイソマルトースであると同定された。

次に α -および β -D-グルコースにそれぞれ別個に精製グルコアミラーゼを作用させ、2種の α -グルコビオースの合成を経時的に追跡定量した結果が Fig. 7 に示されている。この図から、 β -D-グルコースが特異的にこれらの α -グルコビオースの合成に利用されていることは明らかであり、また α -D-グルコースからわずかにこれらの二糖類の合成が見られるのは、反応時間の経過に伴う変旋光の結果生じた少量の β -D-グルコースが利用されたものと解釈される。

さらに、長時間反応における逆合成作用の反応生成物

Fig.8. Saccharides formed in β -D-glucopyranose plus glucoamylase mixtures incubated at 30° for 0.25, 5, and 24 hr.

Material spotted for chromatography contains the products formed from a comparable amount of D-glucose (3.0mg) in each case. S: α -glucobiose standards containing 3.0mg of D-glucose.

の消長を確認するために、短時間反応の場合と全く同じ条件で、グルコアミラーゼと β -D-グルコースとの反応混液を 30°C で15分、5時間、24時間それぞれ作用させた。反応終了後の生成物のペーパークロマトグラムが、Fig.8 に示されている。マルトースは、5時間ならびに24時間の反応混液中にも、15分の場合とほぼ同程度で明瞭にその存在が認められた。一方、イソマルトースは、反応時間が経過するにつれて相当多量に蓄積される傾向が見られた。この事実から、マルトースの合成反応は非常に短時間で平衡に達するものと思われる。

前述のように、本グルコアミラーゼは澱粉およびグリコーゲン等をグルコース単位でほぼ完全に加水分解し、しかもマルトースはイソマルトースに比較して、かなり速かに分解される。従って、本酵素の示す縮合作用に関する実験結果は、水解能に基づいたこの酵素の基本的な性格をそのまま逆合成作用においても反映しているといえる。ここで最も重要な点は、このグルコアミラーゼが特異的に β -D-グルコースを donor として要求し、他の D-グルコース分子を acceptor としてマルトース、イソマルトースを合成する際、donor 分子の configuration の変換を伴うということである。すなわち、donor であ

Fig.9. Synthesis of maltose and isomaltose from β -D-glucopyranose by purified glucoamylase, compared with the known hydrolytic reactions.

The configurational inversion observed in the condensations indicates that the D-glucopyranosyl part of β -D-glucopyranose is interchanged with hydrogen at the C₄ or C₆ carbinol site of a second D-glucose molecule.

る β -D-グルコースは、縮合の結果生じたマルトースあるいはイソマルトースの分子内では α 型をとる。さらに、この縮合反応の機構は Fig.9 に示されるように、donor 分子の D-glucopyranosyl 部分が acceptor である他の D-グルコース分子の C₄ あるいは C₆ carbinol の水素と相互変換したもの、すなわち glucosyl transfer そのものであると理解される。

終わりにのぞみ、私にアミラーゼ研究の機会を与えてくださった、アルバート・アインシュタイン医科大学 Edward J. HEHRE 教授に、また研究を遂行するにあたって、*Candida* の精製 α -グルコシダーゼを提供していただいた愛知教育大学沢井輝男教授に、パノースを提供していただいた農林省食品総合研究所貝沼圭二室長に感謝いたします。さらに、Meicelase を提供していただいた明治製菓株式会社に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) G. OKADA, K. NISIZAWA and H. SUZUKI: *J. Biochem.*, **63**, 591 (1968).
- 2) G. OKADA: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **21**, 283 (1974).
- 3) G. OKADA: *ibid.*, **23**, 143 (1976).
- 4) G. OKADA: *ibid.*, **23**, 147 (1976).
- 5) 不破英次, 二国二郎: 農化, **26**, 154 (1952).
- 6) Y. TSUZISAKA, J. FUKUMOTO and T. YAMA-

- MOTO: *Nature*, **181**, 770 (1958).
- 7) 辻阪好夫, 浜田信威, 竹西繁行: アミラーゼシンポジウム, **10**, 61 (1975).
- 8) N.J.KING: *Biochem.J.*, **105**, 577 (1967).
- 9) L.L. PHILIPS and M. L. CALDWELL: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3563 (1951).
- 10) 鈴木幸雄, 山崎良樹, 坪井 章, 内田 綱: アミラーゼシンポジウム, **8**, 59 (1973).
- 11) E. J. HEHRE, G. OKADA and D. S. GENGHOF: *Arch. Biochem. Biophys.*, **135**, 75 (1969).