放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084 の生産するアミラーゼについて

日高秀昌*・足立 堯*・吉田健治**・丹羽富造**

Studies on the Amylase from *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084

H. HIDAKA,* T. ADACHI,* K. YOSHIDA** and T. NIWA**

* Food Research and Development Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Ltd.
(Kawasaki, Japan)

** Central Research Laboratories (Yokohama, Japan)

An amylase from *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084 was isolated and some properties were studied.

The purification of the amylase was carried by the method of ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and Sephadex G-150 gel filtration to get a single band on a polyacrylamide disc gel electrophoresis. It is shown that the amylase is a kind of α -amylase and produces more than 75% maltose from starch. The amylase was fairly heat-stable and Ca^{2+} was essential for the heat-stability.

The action pattern of the amylase on the starch will be summarized as follows; at the earlier stage of hydrolysis of starch, the amylase produces much maltotriose and maltotetraose. Then maltotetraose is hydrolyzed to maltose and after 30 of DE, maltotriose is hydrolyzed to maltose and glucose. But in this case much maltose is produced by the action of transglucosidation. As the result of these actions, the α -amylase from *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084 produces more than 75% of maltose from starch.

微生物の生産する α -アミラーゼの研究は古く、すでに19世紀末に Wortmann¹⁾ や Bitter²⁾ が細菌に澱粉分解能を認めて以来、実におびただしい数にのぼっている。 α -アミラーゼは α -1,6-結合をとびこして、 α -1,4-結合を at random に切断する酵素であり、基質の急速な粘度低下をもたらして、順次小分子のデキストリンを生成するものであるが、その分解生成物であるグルコース、マルトース、マルトトリオース、その他オリゴ糖の生成量の比はその起源によって異なり、 α -アミラーゼの作用の多様性とされている。

著者らは、澱粉に作用してマルトースを多量生成する酵素を生産する放線菌を得ることを目的として検索を行

い、興味ある菌株数株を得た。本報告ではその中の1株、*Streptomyces hygroscopicus* SF-1084 の生産するアミラーゼの性質と作用、およびマルトースを多量生成する機作について述べてみたい。

実験方法

1. 還元糖の定量と酵素活性 酵素反応は、2%可溶性澱粉 2 ml, pH 5.5, 100mM McIlvaine buffer 2 ml および酵素液 1 ml の混液を、40℃ で3~5分反応させ、生じる還元糖を Schaffer-Somogyi 変法³⁾ で定量した。1時間に 1mg のマルトースを生じるアミラーゼ力を1単位とした。

2. 生成糖の分離定量 ガスクロマトグラフィーを用いて実施した。すなわち、試料の水分を濃縮除去後、sucrose を含むピリジン 0.5 ml に溶解し、hexamethyl-

* 明治製菓株式会社食料研究所 (210 川崎市幸区堀川町580)

** 同社中央研究所 (222 横浜市港北区師岡町)

disilazane 0.45 ml, TFA 0.05 ml を加えてよく混合した後、一夜放置したものを測定用試料とした。カラムは 3 mm×2 m のステンレス製に、chromosorb W 80~100 メッシュ、シリコーン OV-17 5% を用いた。カラム温度は 190°C, 昇温 3°C/min, max. temp. は 320~350°C で実施した。

3. 生成糖の変旋光 不破ら⁴⁾の方法にしたがって、反応生成糖の変旋光を測定した。

4. 等電点分析 LKB 社の 110 ml カラムアンフォライン電気泳動装置を用いて等電点を求めた。

5. SDS ディスク電気泳動 Weber ら⁵⁾の方法にしたがって実施した。

6. 超遠心分析 酵素 3 mg を 5 mM Tris-maleate buffer, pH 6.8 1 ml に溶解し、300 ml の同緩衝液 (0.2 M NaCl を含む) に対して 3 時間透析後、試料に供した。沈降定数の測定は Beckmann Model E 分析用超遠心機を用いて実施した。

7. アミノ酸分析 日本電子 JLC-5AH 型アミノ酸自動分析機を用いて常法にしたがって分析した。すなわち、試料 3 mg を 6N HCl 6 ml に溶解し、真空中で 110°C, 24, 48, 72 時間分解を行い、終了後塩酸を除去して分析に供した。またシスチンは過ギ酸酸化法により、

Fig. 1. Sedimentation pattern of α -amylase from *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084 after 25, 45 and 65 min.

The enzyme solution was 3 mg per ml in 5 mM Tris-maleate buffer with 0.2 M NaCl (pH 6.8).

トリプトファンは吸光度法により測定した。

結 果

1. アミラーゼの精製

本アミラーゼは次のごとく精製した⁶⁾。すなわち、原末 (培養液のアルコール沈澱粉末) を水に可溶化後、酢酸カルシウムを添加して沈澱する画分を除去した後、硫酸 0.3~0.7 飽和で沈澱する画分を集めた。次に、1 mM 酢酸カルシウムを含有する 5 mM Tris-maleate buffer (pH 6.8) に対して 5°C で 1 夜透析後、不溶物を遠沈除去して、DEAE-Sephadex A-50 のカラムで吸着溶離して精製した。吸着は 1 mM 酢酸カルシウムを含む pH 6.8, 5 mM Tris-maleate buffer で緩衝化した DEAE-Sephadex で、溶離は 50 mM の塩化ナトリウムを含有する同 buffer で行った。ここで得られた活性画分を集め、透析脱塩後、同カラムで再クロマトグラフィーを行った後、Sephadex G-150 でゲル濾過を行った。この画分を再クロマトすることによって、アミラーゼは超遠心的に、またディスク電気泳動的に単一の標品を得ることができた。

Table 1 に以上の精製結果をまとめた。また、Fig. 1 に超遠心沈降パターンを示した。

2. 本アミラーゼの性質

前述の方法で精製した単一酵素を用いて、本アミラーゼの酵素化学的、物理化学的性質を明らかにした。

2.1 酵素化学的性質

① 作用最適 pH: Fig. 2 に本アミラーゼの活性に及ぼす pH の影響を調べた結果を示した。pH 5.0~6.0 にその作用最適 pH が認められた。

② pH 安定性: 本アミラーゼの安定性に及ぼす pH の影響を検討した結果を Fig. 3 に示した。pH 6~9 が安定領域であるが、基質が存在していると、酸およびアルカリ側に各々若干安定領域が広がることが認められた。

③ 作用最適温度: Fig. 4 に酵素活性に及ぼす温度の

Table 1. Purification of α -amylase from *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084.

Fraction	Volume (ml)	Amylase act. (u/ml)	Specific act. (u/mg. p)	Recovery (%)
Broth	2,000	1,400	168	100
Ammonium sulfate ppt.	840	2,100	810	63
DEAE-Sephadex A-50	760	1,470	1,450	41
Rechromatography	800	875	2,800	25
Sephadex G-150	50	7,580	6,950	11

Fig. 2. Effect of pH on the activity.

Fig. 3. Effect of pH on the stability for 1 hr at 40°C.

Fig. 4. Effect of temperature on the activity.

Fig. 5. Effect of temperature on the stability for 15 min at pH 5.5.

影響を調べた結果を示した。pH 5.5 における作用最適温度は 50~55°C であった。

④ 温度安定性: pH 5.5, 15分処理での温度安定性を調べた結果が Fig. 5 である。60°C で80%, 90°C で40%以上の残存活性が認められ、かなり耐熱性の優れたアミラーゼと考えられる。

⑤ 生成糖の変旋光: 不破⁴⁾の方法にしたがって反応生成糖の変旋光を測定した。すなわち、DIFCO のデキストリンを基質として反応させ、分解生成糖の変旋光を求めたところ、負であった。

⑥ reducing value と blue value: Robyt と D. French⁷⁾の方法にしたがって、アミロースを基質として、reducing value (R.V.) と blue value (B.V.) との関係を調べてみた。R.V. の増加に比較して、B.V. の急速な低下が認められた。すなわち、本アミラーゼは澱粉に作用して、グルカン鎖の内部から加水分解することが認められた。比較に Taka amylase-A を用いたが、本アミラーゼの方が R.V. の増加に対して B.V. の減少が小さかった。いわゆる multiple attack の傾向を示した。

⑦ 各種阻害剤の影響: Table 2 に各種添加物の影響をまとめた。銀および水銀化合物以外の金属イオンの阻害は認められなかった。また、PCMB による阻害が全く見られないところから、本アミラーゼは SH 基が活性発現に関与しないことが確認された。

⑧ 金属イオンの影響: 本アミラーゼを 5°C で 24時間、10mM の EDTA を含有する 5mM, pH 5.5 の McIlvain buffer に対して透析した後、各種金属イオンを添加して活性に及ぼす影響を見たが、Ag および Hg 以外は活性化や阻害いずれにも関与しなかった。そこで、さらに熱安定性に関する金属イオンの影響を検討した。すなわち、本アミラーゼを上述の緩衝液に 5°C で 2週間透析した後の熱安定性を調べた。透析したアミラーゼの熱安定性は顕著に低下して、60°C、10分処理で残存10~15%を示した。この熱安定性を失ったアミラーゼに Ca^{2+} を 10mM 添加すると、完全に元の熱安定性を示すようになった。この Ca^{2+} に代って Sr^{2+} (SrCl_2) も熱安定性の回復にかなり寄与することが認められたが、 NaCl , MgCl_2 , BaCl_2 など、他のものは熱安定性の回復には全く関与しなかった。

2.2 物理化学的性質

① 等電点分析: アンフォライン電気泳動装置を用いて等電点を求めた。この結果、等電点は pH 5.1 と求められた。

② SDS ディスク電気泳動: Weber らの方法にした

Table 2. Effects of inhibitors.

Inhibitor	Conc.	Residual activity(%)	Inhibitor	Conc.	Residual activity(%)
AgNO ₃	10 ⁻² M	23.9	SrCl ₂	10 ⁻² M	95.5
BaCl ₂	"	105.3	ZnSO ₄	"	90.5
CaCl ₂	"	97.6	Km-sulfate	10 ⁻⁴ M	94.7
CrCl ₃	"	100.0	Tetracycline	"	100.5
FeCl ₃	"	105.3	Nojirimycin	10 ⁻² M	79.2
HgCl ₂	"	4	CH ₂ ICOOH	"	97.0
KBr	"	105.3	Glutathione(SH)	"	110.0
LiSO ₃	"	105.3	Amy. inhibitor	0.01%	26.1
MgCl ₂	"	105.3	EDTA-2NH ₄	0.1 M	100.0
MnCl ₂	"	111.1	PCMB	5×10 ⁻⁴ M	100.0
NaF	"	105.6	o-phenanthroline	10 ⁻² M	100.0
NiCl ₂	"	100.0	SDS	10 ⁻² M	37.1

Fig. 6. Relation between M.W. and R_f of SDS disc electrophoresis.

がって実施した。比較蛋白質としては cytochrome c (ウマ心臓, 12,400), myoglobin(クジラ精子, 17,800), chymotrypsinogen(23,800), ovalbumin(再結, 45,000), albumin(Bovine, 67,000)を用いた。Fig.6 に SDS ディスク電気泳動により得られた R_f と分子量の関係をプロットし、本アミラーゼの R_f から分子量は 48,000 と求められた。

③ 超遠心分析：分子量の測定は meniscus depletion method によって行った。 $s_{20,w}$ は 3.8, 分子量は 47,500 と求められた。上述のディスク電気泳動法で求めた 48,000 とほぼ同一の値を得た。

④ アミノ酸分析：Table 3 に本アミラーゼのアミノ酸分析結果を示した。細菌液化型アミラーゼとはシステイン含有の点で明らかに異なるが、塩基性アミノ酸含有

Table 3. Amino acid composition of α -amylase from *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084.

Amino acid	A.A. content (g/100 g prot.)	A.A. residues (M. W. = 47,500)
Asp	13.59	56
Glu	8.88	27
Pro	2.94	14
Ser	4.54	25
Thr	6.29	32
Gly	6.42	53
Ala	7.95	53
Val	7.55	36
Ileu	2.40	10
Leu	5.19	22
Met	1.33	5
1/2Cys	1.52	7
Tyr	6.48	19
Phe	4.44	14
Lys	6.09	23
His	3.81	13
Arg	5.47	17
(NH ₃)	2.02	56
Trp	2.66	7
Total	97.55	433

量の低い, *Asp.oryzae* と *Asp.niger* とはかなり異なっている。むしろ、ブタ膵臓 α -アミラーゼやヒト唾液 α -アミラーゼに似ている点が多かった。

⑤ N末端アミノ酸：Woods ら⁹⁾の方法にしたがってアミノ末端アミノ酸の測定を行った結果、アルギニンと

同定された。 *Asp. oryzae* の α -アミラーゼの N-末端がアラニン、 *B. stearothermophilus* の α -アミラーゼがフェニルアラニン、 *B. subtilis* の液化型 α -アミラーゼがバリン、 *Asp. niger* の耐酸性 α -アミラーゼがロイシンまたはイソロイシン、非耐酸性 α -アミラーゼがアラニンなど、これからもアミラーゼの多様性を知ることができる。

2.3 本アミラーゼの作用

Table 4 に本アミラーゼのアミロース、アミロペクチン、澱粉およびグリコーゲンに対する作用を示した。

表から見られるごとく、アミロースおよびアミロペクチンから各々マルトースが86%、77%生成する。澱粉からもマルトースが75~78%生成するが、グリコーゲンからは38%のマルトース生成で止ってしまう。これは分岐点 α -1,6-結合に対する作用がほとんどないことを示すものと思われる。また、プルラン、 α -サイクロデキスト

リン、 β -サイクロデキストリンのいずれの基質にも本アミラーゼは分解作用を示さなかった。次に、ポテトスターチに本アミラーゼを作用させ、経時的にサンプリングして、分解率 (DE) とそのときの糖組成を定量した。Fig. 7 にその結果を示した。横軸に DE、縦軸に各種分解糖の生成量をプロットすると、次の事実が認められた。

澱粉の加水分解が開始されると、その初期にはマルトリオースおよびマルトテトラオースが多く蓄積されてくる。すなわち、DE15 まではまずマルトテトラオース

Fig. 7. Time course of potato starch hydrolysis by α -amylase from *Streptomyces hygroscopicus* SF-1084.

Table 4. Action on starches. (%)

Substrate	G ₁	G ₂	G ₃	O
Amylose	10.1	86.1	0	3.8
Amylopectin	9.3	77.2	3.3	10.3
Potato starch	10.4	78.9	8.5	2.2
Corn starch	10.7	75.2	5.6	8.5
Glycogen	8.7	38.4	9.1	59.9

Hydrolysis were performed at pH 5.5, 40°C for 48 hr in the concentration of 0.5% substrate. Amylase was used 10 unit/mg substrate.

G₁: glucose, G₂: maltose, G₃: maltotriose, O: others {100-(G₁+G₂+G₃)}.

Table 5. Time course of hydrolysis of ¹⁴C-maltotriose. (dpm × 10²)

Hours	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆ ≤
0(min)	3 (0.2%)	14 (0.8%)	1,692 (98.7%)	5 (0.3%)	0	0
10	46 (2.8%)	133 (8.1%)	1,439 (87.2%)	28 (1.7%)	0	0
20	57 (3.4%)	155 (9.2%)	1,376 (81.7%)	77 (4.6%)	12 (0.7%)	7 (0.4%)
60	80 (4.7%)	253 (14.9%)	1,258 (74.1%)	87 (5.1%)	13 (0.8%)	7 (0.4%)
24(hr)	412 (27.1%)	1,043 (68.6%)	50 (3.4%)	15 (1.0%)	0	0
48	644 (27.6%)	1,581 (67.8%)	80 (3.4%)	18 (0.8%)	0	0

A mixture of 0.05 ml of U-¹⁴C-maltotriose (50 μ Ci/ml) and 0.4 ml of 5% none radioactive maltotriose was used as a substrate and incubation was performed at 55°C, pH 5.5.

が最も多く蓄積されるが、さらに分解率が進むとこのマルトテトラオースは減少してくる。また、DE30 ぐらいまではマルトトリオースも増加を示し、DE30 を過ぎてようやくその減少が認められる。この間、マルトテトラオースの減少にもかかわらず、グルコースは生成されない。すなわち、マルトテトラオースはほとんどマルトースに加水分解されるものと考えられる。マルトトリオースの分解が始まると見られる DE25 を過ぎてからグルコースの生成が認められるが、マルトトリオースの減少量よりずっと少ないグルコースの生成量である。すなわち、マルトトリオースが単純に加水分解されていれば、マルトトリオースの減少モル数はグルコース、およびマルトースの増加モル数と同じ値を示すはずである。そこで、マルトトリオースが加水分解することによって、より多いモル数のマルトースが生成する機作を検討するため、 ^{14}C でラベルしたマルトトリオースを用いて、経時的に反応生成糖を定量した。その結果を Table 5 に示した。これから明らかなように、分解初期にマルトテトラオース以上の高分子の糖の生成が認められるが、時間の経過とともに再び消失する。この間、マルトトリオースが加水分解されて、グルコースとマルトースを主として生成するが、生成されるマルトース量はモル比計算してもグルコースよりもはるかに多い。すなわち、単なるマルトトリオースの加水分解のみでなく、分解して生じたグルコースがマルトトリオースに転移され、マルトテトラオースとなった後にマルトース 2 分子に分解されるか、さらにグルコースがこのテトラオースに転移されてペンタオースになることもあるのではないと思われる。転移の詳細を以上の事実からのみで議論するのは不十分であるが、マルトトリオースに本アミラーゼを作用させると、グルコースより多いモル数のマルトースを生成すること、反応初期に逆に一部高分子の糖の生成のあることが確認された。なお、本アミラーゼはグルコースおよびマルトースには作用しないことを確認した。

考 察

本アミラーゼが、澱粉に作用してマルトースを75%以上生成することを確認した。このマルトースの生成機作として、次のように考えることができる。1) 本アミラーゼは α -1,4-グルカンに内部から作用して、反応初期にはマルトテトラオースおよびマルトトリオースを多量蓄積する。2) マルトテトラオースはほとんど定量的にマルトースに加水分解される。3) マルトトリオースはグルコースとマルトースに加水分解されるが、転移作用

によって、マルトースをグルコースより多く蓄積する。

4) マルトースは加水分解の初期から生成蓄積が認められる。5) 以上の結果、総和として本アミラーゼは、澱粉に作用してマルトースを75%以上生成蓄積するものと考えられる。

要 約

Streptomyces hygroscopicus SF-1084 の生産するアミラーゼを硫酸塩析、DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150 などの精製工程を経て、ディスク電気泳動、超遠心的に単一にまで精製した。

この単一酵素を用いて、本アミラーゼの酵素化学的、物理化学的性質を明らかにした。本アミラーゼは α -アミラーゼに属することが認められた。

澱粉に作用して75%以上のマルトースを生成することが示された。

マルトースの生成機作について考察を行った。とくに反応初期にマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースが生成すること、マルトテトラオースはマルトースに、マルトトリオースもより多くマルトースに分解蓄積されること、グルコースはマルトトリオースのみから生成されることなどが明らかになり、これらの総和としてマルトースが多量蓄積するものと考えられた。

文 献

- 1) R. WORTMANN: *Z. Physiol. Chem.*, **6**, 287(1882).
- 2) H. BITTER: *Arch. Hyg.*, **5**, 241(1886).
- 3) 小林達吉, 田淵武士: 農化, **28**, 171(1954).
- 4) 不破英次, 二國二郎: 農化, **26**, 154(1952).
- 5) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406(1969).
- 6) H. HIDAKA, Y. KOAZE, K. YOSHIDA, T. NIWA, T. SHOMURA and T. NIIDA: *Die Stärke*, **26**, 413(1974).
- 7) J. F. ROBYT and D. FRENCH: *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 8(1967).
- 8) K. R. WOODS and K. T. WANG: *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 369(1967).

【質問】

京大農 廣海

基質濃度は (i) non-labeled な基質を使用したときと、(ii) all-labeled の maltotriose を用いたときとで同じでしょうか、違うとすれば各々どの程度ですか。

【答】

基質濃度は両者で異なります。non-labeled な基質のときは0.4%ぐらいで、 ^{14}C -labeled のときは、cold も共

存で3%ぐらいになります。

【質問】 大阪市大理 山本

澱粉中の α -1,6-結合は分解されますか。プルランに対しては作用しますか。

【答】

β -リミットデキストリンを用いて実験を行いました。が、 α -1,6-結合は切断しないものと考えられます。プルランは分解しません。

【質問】 長瀬産業 小巻

耐熱性はかなり強いと伺ったが、作用最適温度は50℃ですか。基質存在下における耐熱性の増加、またそのときの Ca 添加の影響、および実用的な糖化温度は何度でしょうか。50℃では工業的に雑菌汚染の問題があります。

【答】

作用最適温度は50~55℃ですが、基質が存在しますと若干耐熱性の増加が認められるようです。必要以上の Ca 添加は効果ないようです。実的には60~62℃ぐらいが可能で、この温度では汚染はかなり押えられるのではないのでしょうか。

【質問】 食品総研 小林

マルトテトラオースの消長については示しておられますが、これより重合度の高いオリゴ糖、たとえば、 G_6 、 G_8 ……などの消長はどのようになっておりますでしょうか。

【答】

高速液クロマトなど使用して現在検討中です。いずれご報告できると思います。