Aspergillus sp. K-27 の生澱粉分解酵素

安部淳一*, フレデリコ W. ベルグマン*,
小幡和哲**, 檜作 進*

Raw-Starch Digesting Enzymes of *Aspergillus* sp. K-27

Jun-ichi ABE, Frederico W. BERGMANN, Kazuaki OBATA* and Susumu HIZUKURI

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
(1-21-24, Korimoto, Kagoshima 890, Japan)

* Daikin Industries Ltd.

(1-1, Nishihitotsuya, Settsu 566, Japan)

A thermophilic fungus, *Aspergillus* K-27, produced extracellular amylolytic enzymes in a submerged culture with wheat starch as a carbon source at 45°C. By adding α -methyl-D-glucoside to the medium as an inducer, the enzyme production was doubled on five days cultivation. The enzymes strongly digested not only cereal but also tuber and root starches without gelatinization. The relative rates of hydrolysis of corn, tapioca, wheat, sweet potato and potato starches were 1.0, 0.91, 0.83, 0.75 and 0.72, respectively.

The crude enzyme fraction exhibited at least two different activities, glucoamylase and α -amylase, and the former was found to be the major one (70%) on treatment of the crude enzyme fraction at pH 3.5 and 45°C. Glucoamylase, which was purified to homogeneity as judged by disc-gel electrophoresis, showed considerable thermostability and resistance to heavy metal ions. The purified enzyme rapidly degraded rabbit liver glycogen and potato amylopectin to the limits of 98% and 81%, respectively, which were identical to those with the enzymes of *Aspergillus niger* and *Rhizopus delemar*. The K_m values of glucoamylase of K-27 for oligosaccharides were almost the same as those of *A. niger* and about half those of *R. delemar*, and the values for polysaccharides were about half those of GIII of *R. delemar* and 1/300-1/2700 of those of the enzyme of *A. niger*. The V_{max} values for all the substrates tested resembled those of the enzyme of *R. delemar* GIII and were 1.5-2 times as high as those of the enzyme of *A. niger* (Ref. 8).

The glucoamylase of K-27 showed higher digestibility of raw starch than the enzymes of *A. niger* and *R. delemar*. The α -amylase alone showed little raw starch digesting activity but it stimulated the activity of the glucoamylase greatly.

近年、省エネルギーの観点より、澱粉からのグルコース・エタノールの生産において、無蒸煮糖化法が注目されている。生澱粉を糖化できる微生物起源の酵素としては、*Aspergillus awamori*¹⁾、*Rhizopus* sp.²⁾ の酵素についての上田らの先駆的な研究や、その他 *A. awamori* var. *kawachii*³⁾、*A. cinamomeus*⁴⁾、*Bacillus circulans* F-2⁵⁾、*Chalara paradoxa*⁶⁾ など強力な酵素の存在が報告されている。しかしながら、いずれも一長一短があり、

実用化に、より優れた酵素の開発が望まれている。最近、この目的のためにわれわれは、生澱粉糖化力が強く、安定性の高いアマラーゼの生産菌を土壌より分離することを試み、これらの菌の酵素の生産性と、酵素の性質について研究を進めている。ここでは、分離した1菌株(K-27株)が、馬鈴薯澱粉の分解力が強いユニークな性質をもつ酵素を生産することを見出したので、その若干の性質について報告する。

* 鹿児島大学農学部 (890 鹿児島市郡元 1-21-24)

** ダイキン工業(株) (566 摂津市西一津屋 1-1)

実験材料および方法

1. 菌株

K-27 株は鹿児島大学農学部 of 土壌より分離し、麦芽エキス培地上で、8℃で保存した。

2. 培養

予備実験の結果、下記の組成の培地が酵素生産に最適であることがわかった。

小麦澱粉 2%，リン酸 2 水素カリウム 0.14%，硝酸アンモニウム 0.1%，コーンステーパーリカー 0.08%，硫酸マグネシウム 0.05%，塩化カリウム 0.05%，酵母エキス 0.01%，硫酸第 1 鉄 0.001%， α -メチル-D-グルコシド (α -MG) 0.2%，pH 6.2。

培養は上記の培地 5 ml を試験管に入れ、滅菌後孢子を接種し、45℃で振とうした。24 時間後坂口フラスコ中の滅菌した 100 ml の培地に移し、45℃で振とう培養した。

3. その他の材料

小麦澱粉、トウモロコシ澱粉、ハイドロキシプロピル化トウモロコシ澱粉は三和澱粉(株)、 α -サイクロデキストリン (α -CD) は日本食品化工(株)の製品を用いた。ウサギ肝臓グリコーゲン は鹿児島大学医学部中川正法博士より恵与された。アミロペクチン・アミロースは、当研究室で馬鈴薯澱粉より調製した。マルトース・マルトリオースは、林原(株)の製品をベーパークロマトグラフィーで純化して用いた。*Aspergillus niger* と *Rhizopus delemar* のグルコアミラーゼは、それぞれ長瀬産業(株)、新日本化学工業(株)製の粗酵素標品を、筆者らの方法^{7,8)}で純化した。 α -CD-セファロース 6B は、セファロース 6B に、Sundberg と Porath の方法⁹⁾で α -CD を結合させて調製した。DEAE-トヨパール 650M は、東洋曹達(株)の製品を用いた。その他の試薬は、市販の最高級純度のものを使用した。

4. 酵素活性測定法

酵素活性は、以下の 2 種の方法で測定した。

1) 1%可溶性澱粉溶液 (50 mM 酢酸緩衝液, pH 5.5 に溶解) 900 μ l に、同じ緩衝液で希釈した酵素液 100 μ l を加え、45℃で反応させた。15 分後、Somogyi 試薬¹⁰⁾ 1 ml を加えて反応を停止し、遊離した還元糖を Somogyi¹⁰⁾-Nelson¹¹⁾ 法で測定した。

2) 2%可溶性澱粉水溶液 200 μ l に、0.02% ウシ血清アルブミンを含む 50 mM 酢酸緩衝液, pH 5.5 で希釈した酵素液 50 μ l を加えて、45℃で反応させた。15 分後 30 秒間煮沸して反応を停止し、遊離したグルコースを

Fig. 1. Growth and the formation of amylases in the culture of *Aspergillus* sp. K-27 in the presence (A) and absence (B) of α -methyl-D-glucoside.

Key: ●, activity (measured by Somogyi-Nelson's method); ▲, pH; ○, residual sugar.

グルコースオキシダーゼ法¹²⁾で測定した。

酵素力価は 1 分間に 1 μ mol のグルコースに相当する還元力を生成する酵素量を 1 ユニット (U) とした。

5. その他の測定法

全糖量はアンスロン硫酸法¹³⁾、還元糖量は Somogyi¹⁰⁾-Nelson¹¹⁾ 法、グルコースはグルコースオキシダーゼ法¹²⁾で定量した。蛋白質量は Lowry 法¹⁴⁾で測定した。

結果と考察

1. 菌の種類

K-27 株は、The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture¹⁵⁾ により調べた結果、*Aspergillus* 属と特定され、45℃でよく生育した。*Aspergillus* 属中で、高温 (45℃) で生育できる種としては、*A. fumigatus* が知られているが、*A. fumigatus* は、分生子柄が緑色であるのに対し、本菌は無色であること、生育上限は、*A. fumigatus* が 50℃であるのに対し、本菌は 55℃で生育できる点が異なり、新種である。

2. 酵素の生産

本菌 (K-27 株) を、酵素誘導物質として α -MG を含む培地と、含まない培地を用いて培養し、経時的に培地中の酵素量・全糖量および pH を測定した結果を Fig. 1 に示す。いずれの場合も、糖は 3 日で消費された。また、pH は、2 日目に低下しその後再び上昇した。酵素

Fig. 2. Effect of pH on activity.

Activities were measured by Somogyi-Nelson's method (—) and by glucose oxidase method (---).

Key: ○, sodium acetate-hydrochloric acid buffer; ●, sodium acetate-acetic acid buffer; ▲, disodium phosphate-monosodium phosphate buffer.

Fig. 3. Hydrolysis of raw corn starch with crude enzyme fraction.

Corn starch (250 mg, dry basis) was suspended in 5 ml of 50 mM acetate buffer, pH 5.5 containing various amounts of crude enzyme fraction and incubated at 55°C under gentle stirring (just enough to prevent settling).

は、pH の上昇および糖が消費し尽くされるころから生産され、5 日目で最大値に達した。α-MG は、酵素の生産を促進し、加えた場合は 12.5 U/ml で加えない場合の 5.5 U/ml の 2 倍以上の生産性を示した。

Fig. 4. Hydrolysis of raw potato starch with crude enzyme fraction.

Conditions, see Fig. 3.

Key: ●, 1 U/mg at 55°C; ○, 0.1 U/mg at 55°C; ▲, 0.1 U/mg at 45°C.

Table 1. Digestibilities of various kinds of raw starches with crude enzyme.

Sources	Initial velocity ($\mu\text{mol Glc/min/ml}$)	Activity ratio (Gel./Raw)
Potato	0.409 (72*)	12.2
Sweet potato	0.426 (75)	11.7
Wheat	0.476 (83)	10.5
Tapioca	0.518 (91)	9.7
Corn	0.571 (100)	8.8

* Relative value.

3. 粗酵素の最適 pH と安定性

培養後、菌体を濾過して除き、得られた濾液を粗酵素液とした。可溶性澱粉を基質とした時の粗酵素液の pH 依存性を Fig. 2 に示した。

最適 pH はグルコースオキシダーゼ法では、pH 4.5～5 付近、一方 Somogyi-Nelson 法では pH 3～3.2 付近と、pH 4～4.5 付近の二つの位置に認められた。この事実、pH 4.5～5 付近は、グルコアミラーゼによるものであり、pH 3～3.2 付近は、共存する α-アミラーゼ (後述) によるものであることを意味する。

4. 粗酵素の生澱粉分解力

トウモロコシ澱粉と、馬鈴薯澱粉を基質として、粗酵素液の生澱粉分解力を検討した結果を Fig. 3 と Fig. 4 に示す。

トウモロコシ澱粉では 55°C, pH 5.5 の条件下で、澱粉 1mg あたり 0.1 U と 1 U の酵素量では、それぞれ 7 時間と 5 時間でほぼ完全に分解した。馬鈴薯澱粉では上記の酵素量で、それぞれ 24 時間と 7 時間でほぼ完全に分

解した。また、馬鈴薯澱粉は、55℃で部分的に糊化がおこる可能性を懸念して、45℃でも作用させたが、55℃に比べて速度の低下は見られたが、24時間後にはほぼ完全に分解された。このように、本酵素は、通常分解されにくい馬鈴薯澱粉をもよく分解することが認められた。そこで、本酵素の特徴を明らかにするために、各種の生澱粉に対する作用を、初速度を測定して比較した (Table 1)。

トウモロコシ澱粉の分解初速度を 100 とすると、甘藷澱粉で 75、馬鈴薯澱粉でも 72 であり、本酵素は穀類澱粉のみならず、根茎澱粉にもよく作用することが認められた。むろん、これらの澱粉を糊化して酵素を作用させた時は、反応初速度に差は見られなかった。生澱粉分解初速度に対する糊化澱粉分解初速度の比をとると、トウモロコシ澱粉の 8.8 から、馬鈴薯澱粉の 12.2 までの値が得られた。従来酵素では、この値は 20~30 であり、本菌の酵素は生澱粉分解力強いことが認められた。

5. 酵素の分離と精製

粗酵素液の pH を 3.5 に調整し、45℃に保温して経時的に活性を、Somogyi-Nelson 法とグルコースオキシダーゼ法で測定した結果を、Fig. 5 に示す。未処理の酵素では、二つの方法で測定した値は一致せず、グルコース以外のオリゴ糖の生成が示唆されたが、2時間の処理で、無処理の酵素の Somogyi-Nelson 法による値の約 70%の値で両者の測定法による値は一致し、6時間後も

変化しなかった。この事実は、粗酵素中の約 70%は、酸性で安定なグルコアミラーゼであることを示している。

未処理の酵素と、上記の条件下で 5 時間処理した酵素を、馬鈴薯アミロースに作用させ、経時的に反応液を取り出して、青価と分解率を測定したところ、未処理酵素では、分解率の増加に対し急激に青価が減少し、約 50%の分解で青価は 0 になった。このことより、粗酵素液中には、 α -アミラーゼが存在することがわかった。一方、処理した酵素では、青価は分解率の増加に対し直線的に減少し、80%の分解率においてもヨード反応は消失しなかった。これらの事実より、粗酵素液中には、pH 3.5、45℃の処理に安定なグルコアミラーゼと、不安定な α -アミラーゼが活性比で 7:3 の割合で存在していること

Fig. 5. Effect of acid treatment on activity.

Activities were measured by Somogyi-Nelson's method (●) and by glucose oxidase-peroxidase method (○).

Fig. 6. Chromatogram of crude enzyme fraction from *Aspergillus* sp. K-27 on α -CD-Sepharose 6B.

Key: —, protein (A_{280}); —○—, activity measured by Somogyi-Nelson's method; —●—, activity determined by glucose oxidase-peroxidase method; , α -CD concentration.

Table 2. Purification of glucoamylase.

Step	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)
Culture filtrate	1,570	16,700	10.6	100
Ammonium sulfate precipitation	393	15,500	39.4	92.8
Isopropanol precipitation	251	14,200	56.6	85.0
α -CD-Sepharose 6B column	149	13,300	89.3	79.6
DEAE-Toyopearl 650 M column	112	1,0100	90.2	60.5

が示唆された。

上述のように、酸性下で熱処理を行うと、ディスク電気泳動的に均一なグルコアミラーゼ標品が得られる。しかし、この方法では α -アミラーゼが得られないので、各種クロマトグラフにより両者の分離を試みた。

粗酵素液を約 5 分の 1 に濃縮後、硫酸アンモニウムを 60% 飽和になるように加え、生成した沈殿を遠心分離し、50 mM 酢酸緩衝液、pH 5.5 に溶解した。不溶物を遠心分離して除き、上澄を氷水中で冷却しながら、あらかじめ -20°C に冷却したイソプロピルアルコールを 50% になるように加えた。ただちに、生じた沈殿を遠心分離して集め、50 mM 酢酸緩衝液、pH 5.5 に溶解し、あらかじめ同緩衝液で平衡化した α -CD-セファロース 6B カラムにかけた。洗液中に 280 nm の吸収が見られなくなるまでカラムを同緩衝液で洗った後、順次 α -CD を高濃度を含む (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/ml) 同緩衝液で吸着した酵素を溶出した。各フラクションにつき、280 nm の吸収、Somogyi-Nelson 法およびグルコースオキシダーゼ法による活性、アンスロン硫酸法による α -CD 濃度の測定を行った (Fig. 6)。

280 nm の吸収では、カラム洗液部分に二つ、 α -CD による溶出画分に一つの大きなピークと二つの小さなピークが見られた。洗液部分の 2 番目のピークは、グルコースオキシダーゼ法では活性が検出できず、Somogyi-Nelson 法でのみ活性があった。したがって、この成分は α -アミラーゼで、カラムに弱いアフィニティを示すため、ボイドボリュームより遅れて出てきたものと理解される。カラムに吸着し、 α -CD で溶出してきたピークは、すべて両者の方法による活性値が一致し、グルコアミラーゼであった。主成分である Fr. 151~162 を集め、次に DEAE-トヨパール 650M でさらに精製し、電気泳動的に均一なグルコアミラーゼ標品を得た。

以上の精製過程の要点を Table 2 に示した。

グルコアミラーゼは最終的に 9 倍精製され、収率は 60.5% であった。このように、本実験で使用した α -CD-

Fig. 7. Effect of temperature on stability of purified glucoamylase.

セファロース 6B アフィニティカラムは非常に有効な手段であった。最終標品中には、ハイドロキシプロピル化トウモロコシ澱粉を使用する鋭敏な検定法⁷⁾によっても α -アミラーゼ活性は見出せなかった。また、ホスファターゼ活性も見られなかった。

6. グルコアミラーゼの性質

本酵素は、分子量 76,000 (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法¹⁶⁾による) の糖蛋白であった。構成糖の主成分はマンノースで、他に微量のガラクトース、グルコース、グルコサミンを含んでいた。

最適 pH は、糊化澱粉に対しては pH 4.5~5.7 付近であり、生澱粉に対しては pH 4.2~5.9 付近と、ほぼ同じであった。また、55°C、30分の処理では pH 4.0~7.1 の範囲で安定であった。

この酵素の耐熱性を、Fig. 7 に示した。55°C では 4 時間後も最初の活性を維持し、60°C、1 時間の処理では 10% 減少した。しかし、65°C では、1 時間で 80% の活性が失われた。これらの結果は、グルコアミラーゼ中では耐熱性が高い酵素であることを示している。

各種の金属イオンの影響を調べた結果、グルコアミラーゼは 5 mM の Hg^{2+} で 15% 阻害されたが、同じ濃度の Al^{3+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} ではほとんど影響を受けず、金属イオンに耐性を有していた。

Table 3. Kinetic constants of glucoamylases.

	K-27		<i>R. delemar</i>						<i>A. niger</i>	
	K_m^a	V_{max}^b	GI		GII		GIII		K_m	V_{max}
			K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Maltose	1100 (1300) ^c	7.9 (11)	1900	11	1900	12	2000	7.8	910	5.0
Maltotriose	350 (440)	37 (51)	590	42	570	43	640	33	300	22
Amylopectin (Potato)	0.2 (0.2)	64 (68)	6.1	78	7.4	74	0.3	61	59	28
Glycogen (Rabbit liver)	0.3 (0.3)	57 (87)	240	68	300	69	0.8	50	820	28

^a μ M (non-reducing, terminal residue).^b U/mg (reaction conditions; 40°C, pH 4.5).^c measured at 45°C.

Fig. 8. Hydrolysis of glycogen, amylopectin and pullulan with purified glucoamylases.

The reaction mixture (2 ml) containing 0.25% substrate, 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 and 5 U of glucoamylase was incubated at 45°C.

Key: ●, rabbit liver glycogen; ▲, potato amylopectin; ○, pullulan; —, enzyme of *Aspergillus* sp. K-27; ----, enzyme of *A. niger*.

7. グルコアミラーゼの作用

精製したグルコアミラーゼを、グリコーゲン・アミロペクチンに作用させると、*R. delemar* のグルコアミラーゼ GIII 酵素と同様の分解曲線を示し、30分でそれぞれ 97.8%, 80.5% の分解率に達し、以後24時間変化がなく、またその後、同量の酵素を添加しても分解の進行は認められなかった (Fig. 8)。これらの分解限度は、われわれがすでに報告した *A. niger*⁷⁾ や *R. delemar*⁸⁾ の精製酵素を用いて得た値と同じであり、グルコアミラーゼの共通作用として、これらの基質を完全分解できないことが確かめられた。プルランを基質とした時は、*R.*

Fig. 9. Hydrolysis of raw corn starch with purified glucoamylases.

Conditions, see Fig. 3.

Key: ○, *Aspergillus* sp. K-27; ●, *R. delemar* GIII; ▲, *A. niger*.

delemar の酵素 GIII の分解と同様の経過を示し、徐々に分解した。

高分子基質としてグリコーゲンとアミロペクチン、低分子基質としてマルトースとマルトトリオースを用い、それぞれの基質に対する動力学定数を求め、それらの値を *R. delemar*, *A. niger* の酵素による値⁸⁾ と比較した (Table 3)。なお、反応は既報のデータと比較のために、40°Cで行った。低分子基質の場合、本酵素の K_m 値は、*A. niger* と同程度で、*R. delemar* のいずれの成分よりも低い値であった。 V_{max} 値は、*A. niger*, *R. delemar* GIII よりやや高く、GI, GII よりわずかに低い値であった。アミロペクチンを用いた時、 K_m 値は、GIII と同程度で非常に小さく、他の酵素の $1/300 \sim 1/400$ であった。グリコーゲンに対する K_m 値は、GIII の $1/2$ で他の酵素の $1/1200 \sim 1/2700$ という低い値を示した。 V_{max} 値は、両基質に対して、*A. niger* の値の2倍で、

Fig. 10. Hydrolysis of raw corn starch with glucoamylase of *Aspergillus* sp. K-27 in the absence and the presence of α -amylase preparation.

Key: ○, glucoamylase (20 U) + α -amylase preparation (5 U); ●, glucoamylase (20 U); ▲, α -amylase (5 U).

R. delemar GIII よりやや高く, GI, GII より少し低い値を示した. 本菌のグルコアミラーゼは, 高分子基質に対しては *R. delemar* の酵素と, 低分子基質に対しては *A. niger* のものと酷似していた. すなわち, 両者の長所を備えた酵素である.

次に3菌のグルコアミラーゼを, 5%生トウモロコシ澱粉に作用させて, その作用を比較した (Fig. 9). 本菌のグルコアミラーゼによる分解率は, 9時間で45%, 24時間で70%であったが, 24時間の分解率は *R. delemar* GIII は40%, *A. niger* の酵素は21%であった. 分解を45°Cで行ったところ, K-27株の酵素と *R. delemar* の酵素とに, 大きな差はなかったが, *A. niger* の酵素は, やはり低い分解率を示した. これらの事実は, *R. delemar* の酵素は, 熱に不安定で, 55°Cでは失活したためと考えられ, また, *A. niger* の酵素は, 熱には安定であるが, 生澱粉分解力は K-27株や *R. delemar* のものより弱いことを示すものである.

8. α -アミラーゼの作用

α -CD-セファロース 6B アフィニティクロマトグラフィーで得た α -アミラーゼ画分 (Fig. 6 のフラクション 34~42) をさらに DEAE-トヨパール 650 M カラムクロマトグラフィーにより精製した. この標品は, pH 5.5, 30分の処理で, 45°Cでは95%活性を維持したが, 50°Cでは77%に減少し, グルコアミラーゼよりも熱安定性が低い酵素であった.

精製グルコアミラーゼによる5%生トウモロコシ澱粉の分解系に, この α -アミラーゼ標品を添加し, この酵素の生澱粉分解の作用を調べた (Fig. 10). 20 U のグル

コアミラーゼに, 5 U の α -アミラーゼを加えて反応させると, グルコアミラーゼ単独にくらべ, 初速度は3倍になり, 24時間後の分解率も13%増加した. しかし, この α -アミラーゼ単独では, ほとんど生澱粉には作用しなかった.

この事実は, すでに上田ら²⁾が *Rhizopus* sp. の酵素系で, α -アミラーゼにはグルコアミラーゼによる生澱粉分解の促進作用があることを報告していることと一致している. この α -アミラーゼについては, 現在さらに精製し, 性質を検討中である.

文 献

- 1) 上田誠之助: 農化, **31**, 898 (1957).
- 2) S. UEDA and K. KANO: *Stärke*, **27**, 123 (1975).
- 3) S. HAYASHIDA and P. Q. FLOR: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2675 (1981).
- 4) 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原寛雄: 農化, **48**, 53 (1974).
- 5) H. TANIGUCHI, G. M. LAE, N. YOSHIGI and Y. MARUYAMA: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 511 (1983).
- 6) 貝沼圭二, 石神 博, 中久喜輝夫, 小林昭一: 昭和58年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 170 (1983).
- 7) J. ABE, Y. TAKEDA and S. HIZUKURI: *Biochim. Biophys. Acta*, **703**, 26 (1982).
- 8) J. ABE, H. NAGANO and S. HIZUKURI: *J. Appl. Biochem.*, in press (1985).
- 9) L. SUNDBERG and J. PORATH: *J. Chromatogr.*, **90**, 87 (1974).
- 10) M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 11) N. NELSON: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- 12) D. M. KILBURN and P. M. TAYLOR: *Anal. Biochem.*, **27**, 555 (1969).
- 13) L. H. KOEHLER: *Anal. Chem.*, **24**, 1576 (1952).
- 14) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 15) J. A. ARX: *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*, Verlag von J. Cramer, Lehre, p. 180 (1970).
- 16) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).

【質問】

大阪市工研 岡田

1. 本菌株の α -glucosidase は?
2. α -Methyl-D-glucoside は, 培養の初期に消失するか?

【答】

1. グルコアミラーゼが過剰に入っているため, α -グルコシダーゼを特異的に定量できません. しかし, い

ろいろ調べても本菌は、 α -グルコシダーゼをまったく生産しないか、もしくはほとんど無視できるレベルのようです。

2. α -メチル-D-グルコシドだけを特異的（たとえば、ガスクロマトグラフ）に定量していません。培養3日目以降では、培地中にほとんど糖がなくなるため、 α -メチル-D-グルコシドも資化されていると考えられます。

【質問】 食品総研 貝沼

アミロペクチン・グリコーゲンのリミットデキストリンを報告されていますが、その残りは、どんな構造のものですか。

【答】

アミロペクチン・グリコーゲンのグルコアミラーゼ・リミットデキストリンの構造は、まだ詳しく検討していませんが、*A. niger* グルコアミラーゼによる馬鈴薯澱粉のリミットデキストリンの構造を調べた結果では、澱粉中に存在するリン酸は定量的に高分子のリミットデキストリン中に濃縮されており、そのリン酸エステル約

60%がリミットデキストリンの非還元末端に存在しています。非還元末端の5個のうち1個は、リン酸化されています（文献7）。

また、*R. delemar* のグルコアミラーゼ・リミットデキストリンも同様の構造をしています（文献8）。

【質問】 東大農化 谷口

1. 精製グルコアミラーゼを馬鈴薯生澱粉に作用させると、どれぐらいの分解率になりますか。

2. 生澱粉の分解率は、グルコース量を測定して出しているのでしょうか。

【答】

1. 精製グルコアミラーゼを馬鈴薯澱粉に作用させた実験は、まだ行っていません。今後行いたいと思っています。

2. 分解率は、グルコース量より計算しています。酵素消化液中の還元糖を、Somogyi-Nelson 法とグルコースオキシダーゼ法の両方で測定していますが、両者の方法での測定値は一致しています。