[澱粉科学 (*J. Jpn. Soc. Starch Sci.*) 第 35 巻 第 1 号 p. 61~67 (1988)]

昭和 62 年度 日本澱粉学会賞受賞講演

澱粉への微生物酵素の利用に関する研究

辻 阪 好 夫*

(昭和 62 年 12 月 28 日受理)

A Study on the Applications of Microbial Enzymes in Starch Processing

Yoshio TSUJISAKA

Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.
(1-2-3, Shimoishii, Okayama 700, Japan)

The present study was carried out to elucidate the actions of fungal enzymes, especially those of glucoamylase and maltase, involved in starch hydrolysis, and to seek strains that produce enzymes favorable for glucose production.

Firstly, the investigation on starch hydrolysis with the use of glucoamylase, isolated as crystal from *Rhizopus delemere* or *Aspergillus niger*, revealed that the glucoamylase hydrolyzes the α -1,6 glucosidic linkages as well as the α -1,4 glucosidic linkages in starch, and also that the glucoamylase possesses, in addition, maltase activity.

Further investigation on the activity of α -glucosidase, crystallized from *Asp. niger*, against maltose showed that the enzyme converts maltose through its transferring action into sugars with α -1,6 glucosidic linkages, including isomaltose and isomaltotriose.

Study on several hundred fungi with the purposes to screen out strains with high glucoamylase productivity but lacking α -glucosidase productivity, and to establish technology feasible for glucose production with the use of glucoamylase resulted in the finding that *Rhi. niveus* satisfies the requirements. This established the enzymatic technology for glucose production world widely practiced today.

このたび澱粉学会賞をいただくことになり、大変光栄に存じております。私の受賞に際しご推薦をくださいました中四国支部長の河村信一郎先生、またご選考いただきました中村道徳会長はじめ諸先生に厚く御礼申し上げます。

私の受賞の題目は“澱粉への微生物酵素の利用に関する研究”であります。ご承知のごとく、ここ 30 年の間の酵素による澱粉加工技術は目覚ましい発展を遂げてまいりました。そして現在では数多くの製品が製造されており、さらに新しい製品の開発について研究が進められております。ひるがえって、私の行いました研究は主としてグルコアミラーゼの澱粉分解機構の解明と、それを基にしたグルコースの製造の基礎技術の開発に関するもの

でありまして、現在の酵素による澱粉加工技術全般から眺めますとごく一部にすぎないのであります。しかもこの研究は 1951 年から 1963 年頃までに行ったものでありまして、すでに 20 年の歳月が経ち、現在のアミラーゼに関する知見や澱粉加工の技術レベルからみますとはなほだ幼稚なものであることとお断りしておきます。

1. グルコアミラーゼの結晶化とその澱粉分解機構の解明について

1) グルコアミラーゼの精製について

私は 1951 年大学を卒業すると同時に大阪市立工業研究所に入り、研究生活を始めました。私が大阪市工研を選んだのは、その当時微生物酵素の研究では第一人者とされていた、故福本寿一郎先生の門下に加えていただきたかったためでした。

* 榊原生物化学研究所 (700 岡山市下石井 1-2-3)

そこで先生から最初にいただいたテーマは“かびの澱粉分解系に関する酵素の研究”でした。福本先生がどのような理由で私にこの研究を命じられたのか、また、その当時のかびの澱粉分解系酵素についての知見がどの程度のものであったか、などについては昨年のアミラーゼシンポジウムの福本先生追悼講演でお話しし、さらに本年（昭和 62 年）の本誌¹⁾にもとくにその点に焦点を当てて書きましたので、今回は要点のみを紹介するに止めます。

私が研究を始めた当時は、まだかびの澱粉分解系には α -, β -の両アミラーゼとマルターゼが存在し、これら三つの酵素の協同作用によって、かびは澱粉をグルコースとして高度に分解することができるのだという古からの考え方が一般に支持されておりました。これに対し、 β -アミラーゼに相当するかびの酵素は澱粉から直接グルコースを生成する作用を持った異質のアミラーゼであるという研究結果が、内外の研究者から報告されはじめたときでもありました²⁻⁵⁾。

しかし、いずれの研究結果も、研究に供された酵素標品が完全に純粋といえるまでに精製されていなかったために、それぞれの研究結果の間には多くの矛盾があり、

はなはだ混沌とした状態でありました。

そこで私達のかびの β -アミラーゼに相当する酵素の澱粉分解機構を明らかにすることと、マルターゼ作用の実態を解明するために、まずこれらの酵素を結晶として単離することから研究を始めました。私どもが酵素の結晶化にこだわったのは、その当時酵素の純粋性を立証する手段としては、結晶化する以外になかったからであります。

研究の対象菌株にはアミラーゼの生産菌として *Rhizopus delemar* を、またマルターゼの生産菌として *Asp. niger* の 1 株を選びました。この二つの菌株を選ぶについてはそれなりの理由がありましたが、その説明は省略いたします。

まず両菌株を小麦麩を用いて固形培養（麩麩培養）し、その水抽出液から酵素の精製を行いました。この当時はアミラーゼの研究のためのかびの培養はほとんど麩麩培養によっていましたが、これはタカジアスターゼの製造を範としたものと思われます。酵素の精製手段も現在使われているような技術はまだほとんど発見されておらず、もっぱら硫酸アンモンによる塩析とアセトンによる分別を根気よく繰り返し行うのが中心でありました。図 1 は

図 1. *Asp. niger* のグルコアミラーゼと α -グルコシダーゼの結晶化法

図 2. 2 種のグルコアミラーゼの澱粉とマルトースの分解

●, *Rhizopus delemar*; ○, *Asp. niger*. —, 可溶性澱粉; ----, マルトース; ———, *Asp. niger* の酵素追加による分解.

Asp. niger のアミラーゼとマルターゼ (α -グルコシダーゼ) を結晶化したときの方法をご参考までに示しておりますが、これがこの当時の最も新しい酵素の精製法でありました。

このような方法によって 1953 年に *Rh. delemar* のグルコアミラーゼ (当時は研究者によって糖化型アミラーゼ, アミログルコシダーゼ, γ -アミラーゼ²⁾, glucamylase⁴⁾ などと呼ばれており, かなり後になって glucoamylase というのが慣用名となった) を結晶として単離することができました⁶⁾. また 1956 年には *Asp. niger* のグルコアミラーゼと, トランスグルコシダーゼ (α -グルコシダーゼ) を結晶化することに成功しました^{7,8)}.

2) グルコアミラーゼの澱粉分解機構について

両アミラーゼを可溶性澱粉に作用させて, その分解限度を調べてみると, *Rhizopus* のアミラーゼは澱粉をほ

ぼ 100 % グルコースとして分解し, 一方 *Asp. niger* のアミラーゼはグルコースとして約 80 % のところで分解が停止することが判明しました. また, 両酵素をマルトースに作用させると, いずれもマルトースを完全にグルコースに分解しました (図 2).

この結果から少なくとも *Rhizopus* のアミラーゼは澱粉の α -1,6 結合を分解すると解釈せざるをえませんでした. しかしそれまで単一酵素が α -1,4 結合と α -1,6 結合を共に分解するということは何人によっても発表されたことがなく, したがって私どもの見解は学会でなかなか認めていただけず, 説得性のある実験結果を示す必要がありました. この問題はその当時, 清酒の中の非醗酵性のオリゴ糖の研究を進めておられた, 東北大学の麻生清教授から, 分子の中に α -1,6 結合をもったいくつかのオリゴ糖を分けていただき, それらに対する作用を調べることによって解決されました. すなわち図 3 に示すように分解される α -1,6 結合は, パノースのように還元性末端以外のグルコース残基にただひとつ存在するものに限られることがわかりました. とくにパノースの場合, その反応液をペーパークロマトグラフィーで調べると反応の初期ではグルコースとマルトースが検出でき, まず α -1,6 結合が分解されることが明らかになりました.

このオリゴ糖に対する実験において, *Rhizopus* の酵素だけでなく, 澱粉分解限度の低い *Asp. niger* の酵素も, このようなオリゴ糖に対してはまったく同じ挙動を示すことが認められました. かくして, かびのグルコアミラーゼは澱粉分解限度のいかんを問わず, 澱粉の枝分れ部分を分解することが実証されたのです.

そうすると α -1,4 結合も α -1,6 結合も共に分解することのできる *Rhizopus* と *Asp. niger* のグルコアミラーゼの間でなぜ澱粉分解限度に差が生じるのかという疑問が残ります. 私達は表 1 に示すような各種の基質に対

図 3. グルコアミラーゼの α -1,6 結合に対する作用性

表 1. 2 種グルコアミラーゼの各種基質に対する作用

	<i>Rhizopus</i>		<i>Asp. niger</i>	
	分解限度(%)	反応速度 ^{a)}	分解限度(%)	反応速度 ^{a)}
可溶性澱粉	100	100	78	100
アミロペクチン	100	105	75	126
グリコーゲン	100		66	
β -リミットデキストリン	100	80	40	80
アミロース	100	27	100	30
マルトトリオース	100	16	100	19
マルトース	100	8	100	15
デキストラン	0	0	0	0
デキストラントリオース	0	0	0	0
イソマルトース	微弱	2.5×10^{-5}	微弱	2×10^{-5}
α -リミットデキストリン	100	55	100	69
6 ² -イソマルトシルマルトース	0		0	
パノース	100	6	100	9

^{a)} 反応速度は可溶性澱粉に対する速度を 100 で表わした。

する作用を調べ、とくに β -リミットデキストリンを *Rhizopus* の酵素は 100% 分解するのに対し、*Asp. niger* の酵素は約 40% しか分解しない事実を認め、このことから、アミロペクチンの内部の緻密な枝分れ構造に対する両アミラーゼの親和力の相違によるものであるという見解を発表しました。

これに対し上田博士らは黒麹菌のアミラーゼが、モチ米アミロペクチンをグルコースとして 100% 分解するが、ジャガイモ由来の可溶性澱粉を 90% 前後しか分解しないという実験結果を得られ、このことから、ジャガイモの場合アミロペクチンを構成する一部のグルコース残基に磷酸がエステルとして結合しているため、アミラーゼの作用はその磷酸結合によって阻害されるが、モチ米澱粉にはほとんど磷酸結合が存在しないために 100% の分解が可能となるのであるという見解を発表されました⁹⁾。

最近になって檜作教授らは、フォスファターゼ作用を完全に除去した *Rh. delemar* のグルコアミラーゼ標品はジャガイモ澱粉の分解率が低いこと、またその切り残し部分から磷酸の結合したグルコースを分離し、アミロペクチン中の磷酸エステル結合がグルコアミラーゼの作用を阻害することを実証されました¹⁰⁾。

私達はグルコアミラーゼの精製に際し、 α -アミラーゼのコンタミには細心の注意を払いましたが、フォスファターゼ作用については厳密なチェックを怠っていました。したがってたまたま *Rhizopus* の酵素標品にフォスファターゼが存在し、*Asp. niger* のそれには存在しなかつ

たために分解限度に差が生じたという可能性は否定できません。いずれにしても酵素の精製ということの難しさと、重要性を痛感いたします。

2. マルターゼ作用について

グルコアミラーゼの基質特異性が明らかになるにつれて、少なくとも“かび”のマルターゼ作用の一部はグルコアミラーゼによることが判明しました。しかし *Asp. niger* からは図 1 に示したように、グルコアミラーゼのほかマルターゼ作用をもつ酵素が単離されました⁸⁾。この酵素の基質に対する作用を調べると、アミロースのような長鎖の基質には作用しないが、マルトースを基質とするとパノース、イソマルトース、イソマルトトリオースのような主として α -1,6 結合をもったオリゴ糖が転移作用によって生成していることが明らかになりました。私どもがこの研究を進めている間に、他の研究者によっても“かび”にこのような酵素が存在するという報告が次々と発表されました¹¹⁻¹³⁾。いずれの酵素もマルトースに最もよく作用して、多様な転移生成物を作ることから、当時はこの種の酵素はマルトーストランスグルコシダーゼと呼ばれていました。最近はこの種の酵素も含め α -結合をもったオリゴ糖に作用する酵素は α -グルコシダーゼと呼ぶように統一されてきました。

私どもの研究でもこの酵素はマルトースに最もよく作用し、基質の重合度が高くなると、作用性が低下し、マルトオリゴ糖の場合重合度 7~8 以上のものには、ほと

んど作用しないことがわかりました。さらに転移作用は基質の濃度に支配され、基質の濃度が低い場合、たとえばマルトースの 0.01% 溶液ではほとんどが加水分解され、濃度が高くなるほど転移生成物の量も多くなることが明らかになりました。

今までの結果から、かびのマルターゼ作用にはグルコアミラーゼとトランスグルコシダーゼ (α -グルコシダーゼ) の二つの酵素が関与していることが明らかになりましたが、このほかにアミラーゼ作用も転移作用も示さない、いわゆるマルターゼが存在するかどうかという問題が残りました。

私もこのような酵素の存否を確かめるため多くのかびや酵母について調べましたが、少なくとも私の調べた範囲では、このような酵素の存在は否定されました。

なお、この研究の結果、*Rhizopus* 属のかびでは私どもの調べた限り、トランスグルコシダーゼを生産する菌株はまったく存在しないことも明らかになりました。このことは、この次にのべるグルコース製造に用いるグルコアミラーゼの起源を決める上で貴重な手がかりとなりました。

3. 酵素法によるグルコースの製造

Rh. delemar のグルコアミラーゼが澱粉を 100% グルコースとして分解することが明らかになったので、この酵素の応用のひとつとして、酵素法によるグルコースの製造技術を開発するため、1957 年から工業研究所内にプロジェクトチームを作り研究を開始しました。あたかもこの頃、余剰サツマイモ澱粉を消化するために、グルコースの製造が国策として推進されておりました。したがって、私もグルコースの原料として、サツマイモ澱粉ないしはジャガイモ澱粉を想定して研究を行いました。

酵素法によってグルコースの製造を工業的に成立させるためには、次のような条件の検討が必要であると考えられました。

- (1) 適当な糖化酵素が経済的に得られること。
- (2) 液化、糖化の条件を決定すること。
- (3) 糖化液の精製およびグルコースの結晶化などの諸条件を決定すること。

まず澱粉から高い収率でグルコースを生成させるためには、糖化酵素剤 (グルコアミラーゼ剤) に α -グルコシダーゼが共存しないことが絶対的な条件となります。

図 4 は *Rh. delemar* の結晶グルコアミラーゼと同菌の

図 4. α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼの協同作用による澱粉の分解

α -A, α -アミラーゼ; Gluc, グルコアミラーゼ; TG, α -グルコシダーゼ。

生産する α -アミラーゼおよび *Asp. niger* の結晶 α -グルコシダーゼの混合酵素液を 10% の可溶性澱粉に作用させて、 α -グルコシダーゼの影響を調べた実験の結果であります。グルコアミラーゼに、 α -アミラーゼと α -グルコシダーゼが共存すると、澱粉の分解率はグルコアミラーゼと α -グルコシダーゼの系よりも低くなります。これは、 α -アミラーゼによって生成したマルトースや低分子のオリゴ糖に α -グルコシダーゼが作用して、グルコアミラーゼで分解されない、イソマルトースやイソマルトリオースなどが生成したためと解せられます。一方、高濃度の澱粉を糖化するためには、必ず α -アミラーゼで液化して粘度を低下させる工程が入りますし、糖化酵素剤のなかにもその微生物由来の α -アミラーゼが存在いたします。したがって、 α -グルコシダーゼが糖化酵素剤に存在しておれば、その酵素剤では高い分解率を達成することは不可能であります。

そこで私達はグルコアミラーゼの生産性が高く、かつ α -グルコシダーゼを生成しない菌株を求めて約 500 種類の“かび”についてスクリーニングを行いました。その結果、先にもふれたように、*Rhizopus* 属は私どもの調べた限り α -グルコシダーゼを生産しないことが明らかになりました。一方、グルコアミラーゼの生産性の観点からは *Asp. niger* などに強力な生産菌が見出されましたが、いずれも α -グルコシダーゼの生成を伴うものであります。このようなスクリーニングの結果、*Rhizopus niveus* をグルコアミラーゼの生産菌と決定いたしました。現在では *Asp. niger* の変異株を使ったり培養

本中で約 60 のブドウ糖工場が生産を行うようになりました。

その結果、サツマイモ澱粉の供給が不足し、ブドウ糖原料はコーンスターチへと代わりました。このため私達の考案した液化法では部分的に液化されない物が残り、濾過工程で著しい手間がかかる上、グルコースの収率や品質も低下するようになりました。

これに対処するため、小巻博士によって二段液化法が考案され¹⁵⁾、さらに耐熱性 α -アミラーゼの開発が行われて¹⁶⁾、コーンスターチの液化が可能となりました。

一方佐藤博士ら¹⁷⁾および高崎博士ら¹⁸⁾によってグルコースイソメラーゼ (キシロースイソメラーゼ) が開発され、グルコースを原料として、異性化糖の製造が行われるようになりました。

現在グルコースと異性化糖を合わせると、全世界で 1,000 万トン以上が製造されているといわれております。

おわりに

以上が私の行いました研究の概要であります。大変古い話で恐縮いたしております。

現在の研究技術は 30 年前には想像だにできなかったことを可能としつつあります。その結果、多くのアミラーゼについて、そのアミノ酸配列が決定されております。やがてアミラーゼの構造と機能との関係が明らかになり、さらに蛋白工学的手段を使って、既存のアミラーゼを、より使い勝手の良い性質をもったものへと改変することも可能となるでしょう。

しかし、私は新しい澱粉加工技術が開発されるためには、今までに知られなかった作用をもつ新しい酵素の発見が必要であり、依然として微生物のスクリーニングという地道な努力は欠かせないものと確信しております。

終わりに当たり、まず私にこの研究テーマをくださり、終始ご指導くださいました故福本寿一郎先生の御霊に感

謝いたします。また研究の遂行に当たり、ご協力いただいた大阪市立工業研究所の元職員南井邦美、岩井美枝子、木本和久の諸氏と多数の研究員の方々にお礼申し上げます。

さらに私どもの研究を信頼し、酵素によるグルコース製造の工業化を決意された、故林原一郎氏の英断に敬意を表します。またその工業化に当たり多くの困難を克服し、工業化を達成された林原悌の技術陣の諸氏にも敬意を表するものであります。

文 献

- 1) 辻阪好夫: 澱粉科学, **34**, 137-139 (1983).
- 2) 北原寛雄, 久留島通俊: 醸工, **27**, 254-257 (1949).
- 3) 岡崎 浩: 農化, **24**, 88-91 (1950).
- 4) L. L. PHILLIPS and M. L. CALDWELL: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3559-3562 (1951).
- 5) 山崎阿恵, 上田誠之助: 農化, **24**, 181-184 (1950).
- 6) 福本寿一郎, 辻阪好夫, 南井邦美: 科学と工業, **28**, 92-99 (1954).
- 7) Y. TSUJISAKA, J. FUKUMOTO and T. YAMAMOTO: *Nature*, **181**, 770-771 (1958).
- 8) 辻阪好夫, 福本寿一郎: 農化, **37**, 668-672; 747-752 (1963).
- 9) 上田誠之助: 醸酵協会誌, **16**, 521-527 (1958).
- 10) J. ABE, H. NAGANO and S. HIZUKURI: *J. Appl. Biochem.*, **7**, 235-247 (1985).
- 11) 柴崎一雄: 農化, **32**, 133-138 (1958).
- 12) J. H. PAZUR and D. FRENDR: *J. Biol. Chem.*, **196**, 265-271 (1952).
- 13) 岡崎 浩: 農化, **32**, 316-320 (1958).
- 14) 辻阪好夫: 大阪市立工業研究所報告, **23**, 59-69 (1980).
- 15) 小巻利章: 澱粉科学, **27**, 158-164 (1980).
- 16) 斉藤成正: アミラーゼシンポジウム, **9**, 69-78 (1974).
- 17) 佐藤友太郎, 津村信蔵: 特公, 昭 41-17640.
- 18) 高崎義幸, 田辺 脩: 特公, 昭 41-7431.