総 説

Bacillus circulans F-2 の生産するアミラーゼと
その生産調節機構について

佐 田 洋*

Amylase and Regulation of Its Synthesis in *Bacillus circulans* F-2

Hiroshi SATA*

* Central Research Laboratory, Oji Cornstarch Co., Ltd.
(9, Yawatakaigandori, Ichihara, Chiba 290, Japan)

Bacillus circulans F-2 has three unique properties : it produced G6 preferentially from soluble starch in the early stage of hydrolysis ; it digested potato starch granules effectively ; and it produced some kinds of amylase only when raw starches were used as a carbon sources. Therefore, the amylase and regulation of its synthesis in this bacterium were studied.

We newly purified two amylases (amylase I and III) that are different from a major amylase (amylase II), having potent raw starch-digesting activity. Amylase I hydrolyzed α -1,4-glucosidic and α -1,6-glucosidic linkages at the same rate. Enzymatic properties of amylase III were almost the same as that of amylase II. The physiological significance of amylase is that they act synergistically in digesting starch granules.

Potato and corn starch granules were cross-linked by epichlorohydrin to various extents (degree of cross-linking, DC=0.6-7.1). Using these starches as a carbon source for the cultivation of this bacterium, production of amylase was investigated. CLP (cross-linking potato starch, DC=4.0) induced 0.6 U/ml of amylase, which is 1.8 times as much as that on raw potato starch.

B. circulans F-2 was found to produce amylase on maltose or soluble starch media if it is grown in appropriate condition such as dialysis and feeding cultivation, *i. e.*, condition to afford the low bacterial growth. Its amylase synthesis is inducible by maltooligosaccharides and severely repressed by glucose. High amylase production was always accompanied by low α -glucosidase production and the absence of glucose in culture broth.

In the presence of 1-deoxynojirimycin (DNM), an inhibitor of α -glucosidase activity, the bacterium produced a significant amount of amylase even in batch cultivation on maltose.

From these results, the regulation of amylase synthesis in *B. circulans* F-2 is affected by its high sensitivity to glucose repression and by the production of α -glucosidase which leads to the formation of glucose.

はじめに

アミラーゼ (ブタ膵臓 α -アミラーゼ¹⁾ や麦芽 α -アミラーゼ²⁾) が生澱粉を分解することは古くから知られて

いたが、その分解能はトウモロコシ澱粉等の地上澱粉に対するものであり、地下澱粉である生バレイショ澱粉にはほとんど作用できないものであった³⁾。谷口⁴⁾らは生バレイショ澱粉を資化できる *Bacillus circulans* に属する一菌株 *Bacillus circulans* F-2 を単離し、本菌の生産するアミラーゼ (電気泳動的に移動度の低いものか

* 王子コーンスターチ(株)開発本部中央研究所 (290 市原市八幡海岸通り 9 番地)

Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of the amylases.

a) Native-PAGE (activity staining for cultured supernatant on CLP. Amylases were divided into 4 groups from I-IV).

b) SDS-PAGE (Silver staining). Lane 1, amylase I; 2, amylase II; 3, amylase III. M. W., molecular weight marker.

ら 1～9 本の各バンドに分け、おのおのを以下のように群分けした；1, 2 をⅠ群, 3, 4, 5 をⅡ群, 6, 7 をⅢ群および 8, 9 をⅣ群の四つに分けた (Fig. 1a) のうちⅡ (Ⅱ群の 3, 4 に相当) を精製後, その触媒作用ならびに酵素生産条件について検討した。その結果, 1) 本アミラーゼは強い生バレイショ澱粉分解力を示す, 2) 本アミラーゼは可溶性多糖に対してその非還元末端から *exowise* に作用し α 型のマルトヘキサオース (G6) を生成する, 3) 本アミラーゼは可溶性糖 (グルコース, マルトースおよび可溶性澱粉) を炭素源として用いたときにはほとんど生産されないが, 生澱粉, 特に生バレイショ澱粉を用いたときに最も多く生産される, という他のアミラーゼにはない著しい特徴が明らかにされた。しかしながら, 本菌のアミラーゼ生産における生バレイショ澱粉の役割, すなわち澱粉粒の存在によって酵素の生産性が向上する理由については何等解明されていなかった。

一方, *Bacillus* 属におけるアミラーゼ生産調節機構について多くの報告がなされており, 誘導とカタボライトリプレッションによって説明がなされている⁵⁾。 *B. stearothermophilus*⁶⁾ や *B. licheniformis* 584⁷⁾ においてはマルトテトラオース (G4) によるアミラーゼの誘導が報告されている。また, *B. amyloliquefaciens*⁸⁾, *B. subtilis* 168⁹⁾ や *B. licheniformis* NCI B6346¹⁰⁾ のように, グルコースや他の単糖類によってアミラーゼが生産される構成的な菌も数多く報告されている。一般的に, 誘導

的なアミラーゼ生産は菌に早く代謝される炭素源の添加で即座にその合成が停止されるカタボライトリプレッションの支配下にあることも調製機構を考える上で重要な要因とされている。ところが, *Bacillus* 属のアミラーゼ生産調節機構は使用した strain の多様性や培養条件の違いによって必ずしも明確にされておらず, *E. coli* での誘導やカタボライトリプレッション¹¹⁾に基づいた類推の域を出ていないものであった。更に *Bacillus circulans* F-2 では *Bacillus* 属共通とも考えられるマルトースや可溶性澱粉によるアミラーゼ生産がどの培養時期にも見られず, 生澱粉でのみその効果を示すことは, 従来のアミラーゼ生産機構では説明のつかない機構が働いているように思えた。

しかも, 生澱粉を培養の炭素源として用いる場合オートクレーブによる滅菌処理 (120°C, 20 min) は行えず, エチレンオキシドガスで他の培地組成と分離して行われなければならない。これは大量培養実験等における操作の煩雑さを助長するものであった。そこで他の培地成分とオートクレーブ処理後もアミラーゼ生産能を有する炭素源を求めて各種化工澱粉について検討したところ, エピクロルヒドリン架橋澱粉が生バレイショ澱粉以上の生産性を示した¹²⁾。しかしながら, 架橋澱粉を用いたときも培養液中に得られたアミラーゼの電気泳動における活性バンドは生バレイショ澱粉と同じく 4 群に分かれる多様性を示した。

本文においてはそれら多様性を示すアミラーゼのうち新たにアミラーゼⅠ (Ⅰ群の 2 に相当) およびⅢ (Ⅲ群の 6, 7 に相当) を精製し, その酵素化学的な諸性質を明らかにすると共に本菌におけるそれらの役割について検討した。更には, 種々の培養方法 (アミラーゼ誘導能が生バレイショ澱粉より高いエピクロルヒドリン架橋澱粉を用いたバッチ, 透析培養および可溶性糖を用いたフィーディング培養) によって本菌のアミラーゼ生産調節機構の解明を行ったものである。

1. *Bacillus circulans* F-2 のアミラーゼⅠおよびⅢの精製

アミラーゼⅠは硫安塩析後, 澱粉未吸着画分を DEAE-Toyopearl 650 M よるイオン交換クロマトグラフィーおよび TSK Gel Phenyl-5 PW による疎水性クロマトグラフィー (HIC) によって, アミラーゼⅢは硫安塩析後, TSK Gel Phenyl-5 PW による HIC によって精製された。得られた最終酵素標品はアミラーゼⅠ, Ⅲ共に電気泳動 (SDS-PAGE, Fig. 1 b) において均一なバン

ドを示した。アミラーゼ I は SDS-PAGE およびゲルろ過法より分子量が約 218,000 と推定され、糖鎖 (PAS 染色) は検出されなかった。各種可溶性多糖およびマルトオリゴ糖に対する作用を初速度と比較し、Table 2 に可溶性澱粉に対する値を 100 として相対値で示した。プル

Table 1. Relative initial rates of hydrolysis of saccharides by amylase I.

Saccharide	Initial rate (%)
Soluble starch	100
Amylose	114
Amylopectin	95
Oyster glycogen	85
Amylopectin- β LD	65
Pullulan	105
Dextran	0
Maltohexaose	15
Maltopentaose	20
Maltotetraose	2
Maltotriose	11
Maltose	4
Isomaltose	0
Panose	0
Isopanose	0
6 ² - α -maltosyl-maltose	32

ランが可溶性澱粉と同じ速度で分解されるが、デキストランは分解できなかった。そこで、可溶性澱粉およびプルランの分解生成物を薄層クロマトグラフィー (TLC) で検討したところ、Fig. 2, a, b に示すように可溶性澱粉に対しては一連のオリゴ糖が生成し、プルランに対してはマルトトリオース (G3) が生成していることが判明した。直鎖マルトオリゴ糖に対しても分解は行いが、その速度は非常に遅く、分岐マルトオリゴ糖 (パノース、イソパノース) に対してはまったく作用しない。一方、6²- α -マルトシルマルトース (B4) に対しては可溶性澱粉の 32% の速度で分解しマルトオリゴ糖に比べ若干速く、反応生成物はマルトースのみである。このことは、B4 に対してはプルラナーゼとして作用することを示すものであった (Fig. 2c)。従来より、 α -1,6-グルコシド結合に作用するアミラーゼは *Thermoactinomyces vulgaris* 由来のアミラーゼ¹³⁾ が知られているが、イソパノースに対する分解速度と本酵素の G3 や可溶性澱粉に対する分解速度と比べればそれぞれ 1/20, 1/600 と非常に低く、本酵素の特異性が明らかにされた。このようにアミラーゼ I は α -1,4-グルコシド結合と α -1,6-グルコシド結合を同速度で作用する特異な性質を有していた¹⁴⁾。

アミラーゼ III の分子量 (105,000) はアミラーゼ II (93,000) よりもやや高いものの、その酵素化学的性質

Fig. 2. Thin-layer chromatograms of the hydrolysis of the purified enzyme (amylase I).

Portions (10 μ l) were withdrawn from the standard reaction mixtures at the indicated times and spotted on thin-layer plates.

a) Products from soluble starch. b) Products from pullulan. c) Products from 6²- α -maltosylmaltose. S, standard maltooligosaccharides; P, panose; IP, isopanose; IM, isomaltose.

Table 2. General properties of the purified amylases.

Properties	Amylase		
	I	II	III
Specific activity (U/mg protein)	80.0	54.8	60.0
Molecular weight	218,000	93,000	105,000
Isoelectric point	4.13	4.88, 4.93	4.40
pH optimum	7.0-8.5	6.0-6.5	6.4
pH stability	5.0-9.0	6.5-12.0	6.0-11.0
Temp. optimum (°C)	50	60	70
Temp. stability (°C)			
100%	40	35	40
0%	60	55	60
Digestibility (%)			
Corn	2.7	28.6	20.0
Potato	1.3	10.1	7.5
Action pattern	endo	G ₆	G ₆
Pullulanase activity	+	-	-
Immunodiffusion by antibody of II	-	+	+

(至適 pH, 至適温度, 基質に対する作用) はアミラーゼ II とほとんど同じであった (Table 2).

生澱粉分解能についてアミラーゼ I はほとんど有さないが, アミラーゼ III はアミラーゼ II と同程度の分解能を示した. ただし, アミラーゼ I をアミラーゼ III と一緒に作用させると, アミラーゼ II 以上の分解能を示した.

アミラーゼ II に対する抗体をウサギ血清より調製し, 精製酵素と免疫沈降法による沈降反応の有無および活性阻害度を測定した. アミラーゼ I はまったく沈降反応を示さず活性の阻害を受けなかったが, アミラーゼ III はアミラーゼ II と同等の活性阻害を受けた. これらの結果より, アミラーゼ I は II および III とは酵素化学的・免疫学的諸性質がまったく異なるアイソザイムの, アミラーゼ II, III は同じ遺伝子より発現され何らかの作用により生じた多型性の可能性が高いと推定した. また, アミラーゼ I は可溶性澱粉に対して endo に作用し, 更には生澱粉の分解において他のアミラーゼとの協同的な作用により澱粉分子の低分子化に寄与していると思われる. 上記で述べた以外のアミラーゼ I および III の酵素化学的性質も併せて Table'2 にまとめた.

2. 架橋澱粉による *Bacillus circulans* F-2

アミラーゼの誘導

架橋度 (Degree of Crosslinking; DC) の異なる種々

のエピクロルヒドリン架橋澱粉を用いて本菌でのアミラーゼ生産性について検討した. すなわち, DC の異なるエピクロルヒドリン架橋バレイショ澱粉 (CLP) およびトウモロコシ澱粉 (CLC) を調製し, オートクレーブ後本菌の培養の炭素源として用いた. これらの澱粉はオートクレーブ後も澱粉粒構造を保持していたが, 結晶構造はほとんどみられなかった. 本菌の培養時の DC と菌の増殖速度との関係を Fig. 3 に示した. DC の高い澱粉は低い澱粉よりゆっくりと分解され, その結果菌はゆっくりと増殖する. 同じ DC においては CLP か CLC よりも増殖速度が若干遅い傾向にあった. 一方, アミラ

Fig. 3. Effect on the rate of bacterial growth on CLP and CLC.

○, CLP; △, CLC.

Fig. 4. Relation between DC of cross-linked starch and maximum amount of amylase production.

○, CLP; △, CLC. The maximum amounts of amylase produced on raw potato and corn starch were 0.33 and 0.07 U/ml, respectively.

ーゼ生産量は DC の増加と共に増大し、CLP は同一 DC の CLC に比べアミラーゼ活性は常に高く、その差も約 0.3 U/ml ある (Fig. 4). このことは、架橋反応以外にも使用した澱粉の起源によって本菌のアミラーゼ生産性が異なることを示唆している. CLP (DC=4.0) におけるアミラーゼ最高活性は 0.6 U/ml で生バレイショ澱粉の 1.8 倍であり、調製した架橋澱粉のなかで最高の活性を示した.

このように、*Bacillus circulans* F-2 が生澱粉や架橋澱粉のような粒構造を有している炭素源でしかアミラーゼを生産しないことは不可解な現象である. バチルス属でのアミラーゼ誘導機構から考えて、本菌が直接澱粉粒を認識してアミラーゼの生産を促していることは考えにくく、ある種の可溶性の誘導物質が関与している可能性が高いと思われた. そこで、最高のアミラーゼ生産性を示した CLP (DC=4.0) での培養液中の可溶性糖成分を分離しその組成を調べた. グルコース (G, 37%), マルトース (G2, 26%), マルトトリオース (G3, 9%), マルトテトラオース (G4, 5%) および未同定画分 (Unknown Fraction; UF, 23%, エピクロロヒドリン残基を有するオリゴ糖と推定) からなる成分であり、これらの各成分を単独もしくは混合物を本菌の培養の炭素源としてアミラーゼ生産性を調べた. しかしながら、いずれの糖成分もアミラーゼ生産においては何ら効果を示さなかった. このことは、本菌のアミラーゼ生産に澱粉粒の存在が必要であることを示唆するものであった¹⁵⁾.

3. *Bacillus circulans* F-2 のアミラーゼ生産調節機構

澱粉粒が本菌のアミラーゼ生産にどのような役割を果たすか、その生産調節機構の解明を行った. 透析チューブ中に CLP とアミラーゼ II を添加密封後、その外側に炭素源を除いた培地組成とともに菌を接種する透析培養を行った. 本条件下では、菌は澱粉粒と接触できず透析膜を介してゆっくりと拡散される澱粉から酵素的に切り出された可溶性糖分のみを資化するのみである. その結果、菌は増殖し、しかもアミラーゼを生産した. このことは、アミラーゼ生産に澱粉粒は必須な因子でなく酵素的に切り出された可溶性糖が関与していることを示すものである. CLP の代わりに可溶性澱粉を用いた透析培養においてもアミラーゼの生産が確認することによって更に明確にされた. そこで、どのような可溶性糖が関与しているか菌を接種しない条件下での培地組成を分析した結果、G (15%), G2 (40%), G3 (13%), G4 (30%) であった. しかしながら、これら可溶性糖もしくは各成分はバッチ培養の炭素源として用いても、前述したようにアミラーゼは生産されなかったものである. 再度アミラーゼ生産に関わる要因を把握するため、バッチおよび透析培養での菌の増殖速度、 k (対数増殖期における単位時間当りの 660 nm の吸光度の増加)、とアミラーゼ生産性との関係について調べた. その結果を Table 3 に示すが、 k 値が低いほどアミラーゼ活性は高くなっており、アミラーゼ合成の differential rate, K_a (660 nm の吸光度の増加に対するアミラーゼ活性の増加; 菌に対するアミラーゼの比生産性)⁶⁾ も高くなる傾向を示していた. すなわち、これらのことは可溶性糖 (G2 や可溶性澱粉) を用いたバッチ培養においても菌の増殖を抑制すれば高いアミラーゼ生産が得られる可能性を示唆するものであった.

その可能性を確かめるために、G2 を種々のフィーディング速度で添加するフィーディング培養を行った. Fig. 5 に示すように、菌の増殖速度を抑えた条件下でアミラーゼが生産され、アミラーゼの最高活性を与える至適フィーディング速度 (45 mg/hr-l) が存在した. それ以上のフィーディング速度では増殖速度の増加と共に活性は低下した. 他のマルトオリゴ糖 (G2-G6) においても上記条件下でアミラーゼが生産されたが、単糖 (アラビノース, キシロース, グルコース, フラクトース), 糖リン酸 (グルコース 1-リン酸, グルコース 6-リン酸) および二糖類 (イソマルトース, セロビオース, ラクト

Table 3. Effect of growth rate on amylase production.

Carbon source	Harvest time (hours)	$k_a^a)$	Amylase activity (U/ml)	$K_a^b)$
Batch Cultivation ^{c)}				
Glucose	10	0.17	<0.01	<0.01
Maltose	10	0.16	0.01	<0.01
Maltotriose	10	0.15	0.01	<0.01
Maltotetraose	10	0.15	0.01	<0.01
Raw potato	48	0.073	0.23	0.09
CLP(DC=0.6)	48	0.11	0.25	0.06
CLP(DC=2.5)	48	0.05	0.36	0.16
CLP(DC=4.0)	192	0.021	0.60	0.29
Dialysis Cultivation				
CLP ^{d)}	43	0.033	0.37	0.28
Soluble starch	24	0.065	0.30	0.20

^{a)} Rate of bacterial growth (hr^{-1}).

^{b)} Differential rate of amylase synthesis (U/ml/absorbance unit).

^{c)} Batch culture with 1% carbon source.

^{d)} Cultivation on high concentrations of CLP and amylase.

Fig. 5. Effect of feeding rate of maltose on bacterial growth and amylase production in feeding culture.

○, rate of bacterial growth. ●, amylase activity at 10 hr. △, differential rate of amylase synthesis.

ース、スクロース))では菌は増殖するもののアミラーゼはまったく生産されなかった。すなわち、本菌のアミラーゼは α -1,4-グルコシド結合を有するマルトオリゴ糖によって誘導されたことが判明した。

加えて、G2のフィーディング培養時におけるアミラーゼ生産に及ぼすグルコースの影響についても検討を行

った。グルコースは添加するG2の一部と置換することによって炭素源として一定量を添加した。Table 4に示すように、 K_a はグルコースの比率が増加するに従い低下し、20%のグルコースの置換で著しい K_a の減少(70%)が認められた。このことは、本菌のアミラーゼ合成がグルコースによって抑制され(グルコースリプレ

Table 4. Effect of glucose on amylase production in feeding culture with maltose.

Glucose ^{a)} (%)	k ^{b)}	Amylase activity ^{c)} (U/ml)	Ka ^{d)}
0	0.035	0.22	1.04 (100)
5	0.038	0.25	0.98 (94)
10	0.043	0.30	0.91 (88)
20	0.039	0.05	0.31 (30)
100	0.033	<0.01	<0.01 (<1)

a) Desired amount of maltose was replaced by glucose and the feeding culture with maltose or maltose plus glucose was carried out.

b) Growth rate (hr⁻¹).

c) Culture was harvested at 10 hr.

d) Differential rate of amylase synthesis (U/ml/absorbance unit).

The differential rate of amylase synthesis on maltose was taken as 100%.

クション), しかもその抑制が非常に感受性の高いグルコースリプレッションに支配されていることが示された¹⁶⁾.

このグルコースリプレッションは c-AMP の添加によって回復されず, 菌体内での濃度 (0.2~0.5 nM) が *E. coli* (0.5~10 μ M)¹¹⁾ に比べて非常に低いことから, c-AMP を介した機構とは異なっていると推定される.

4. *Bacillus circulans* F-2 での α -グルコシダーゼの作用による アミラーゼ生産の抑制

本菌のアミラーゼ生産が誘導条件下でも非常に強いグルコースリプレッションの支配下であることを考慮すれば, G2 を炭素源として用いたバッチ培養においてもグルコースリプレッションによりアミラーゼの生産が抑制されていると推定される. 前述したように, 本アミラーゼは G2 にほとんど作用せず培養液中にグルコースが蓄積される可能性は非常に少ない. しかしながら, G2 を用いたバッチ培養液中に可溶性糖分に対して約 1% のグ

ルコースが検出されることより, 本菌において G2 加水分解酵素の存在が示唆された. 各可溶性糖 (グルコース, G2 および可溶性澱粉) や CLP を用いたバッチ培養で得られた培養液中のグルコース量およびアミラーゼ活性の関係について検討した (Table 5). G2 および可溶性澱粉を用いた場合, 0.06~0.11 mg/ml のグルコースが検出されアミラーゼの生産はまったくみられなかった. 一方, CLP の場合, ほとんどグルコースは検出されず, 非常に高いアミラーゼ活性が認められた. また, グルコースにおいては両酵素の活性は非常に低いものであった. そこで, 本菌のグルコース生成に関与すると思われる菌体内, 外の α -グルコシダーゼ活性を測定した結果, 20~30 mU/ml 程度 (Table 5) の活性が検出され, しかも活性の 90% 以上が菌体内に存在することが判明した. 本酵素の各種基質に対する作用はマルトオリゴ糖やアミロース (重合度; 17) にのみ作用し, 特に G2 に対する加水分解速度が最も速かった. しかも, α -グルコシダーゼ活性が高い G2 や可溶性澱粉でのバッチ培養の場合アミラーゼ生産は低く, 逆に高いアミラーゼ生産を示

Table 5. Effect of carbon sources on the production of α -glucosidase and amylase in batch cultivation of *B. circulans* F-2.

Carbon source	Harvest time (hr)	ka ^{a)} (hr ⁻¹)	α -Glucosidase (mU/ml)	Amylase (mU/ml)
Glucose	10	0.17	1.4	<10
Maltose	10	0.16	35.5	10
Soluble starch	10	0.20	24.4	20
CLP(DC=2.5)	48	0.05	8.7	360

a) Rate of bacterial growth.

Fig. 6. Time course of batch cultivation on maltose.

○, bacterial growth; ●, amylase activity; ⊙, α-glucosidase activity; ⊖, concentration of maltose in the medium; Δ, pH.

した CLP では α-グルコシダーゼ活性は比較的低い値を示した。

G2 を炭素源とした場合の *Bacillus circulans* F-2 における経時的な α-グルコシダーゼ活性を Fig. 6 に示した。α-グルコシダーゼは菌の増殖にともなって生産されるが、アミラーゼはどの時期においてもほとんど生産されず、可溶性糖分中 1% のグルコースが検出された。同様に G2 を炭素源としたフィーディング培養における α-グルコシダーゼの生産性についても検討を行った。フィーディング速度の増加に伴い菌の増殖速度は増大し α-グルコシダーゼ活性も同様に増大した。ところが、アミラーゼ活性はフィーディング速度 45 mg/hr⁻¹ で最高活性を示し、それ以上では逆に減少した。すなわち、アミラーゼの最高活性を示すフィーディング速度においては α-グルコシダーゼ活性は比較的強くそれ以上では急に高くなり、アミラーゼ活性とは相反する関係にあった。更に、α-グルコシダーゼの differential rate (Kg) とアミラーゼ生産 (Ka) における関係を Fig. 7 に示した。Ka は Kg が約 7.0 まではほとんど変化しないが、それ以上では急激に低下した。

α-グルコシダーゼの生産性に及ぼす単糖 (アラビノース, キシロース, グルコース, フルクトース), 二糖 (G2, イソマルトース, ラクトース, スクロース, セロビオース), マルトオリゴ糖 (G3, G4, G5, G6) の効果について検討した結果, アミラーゼ生産同様 α-1,4

Fig. 7. Effect of Kg on Ka.

Kg, differential rate of α-glucosidase synthesis; Ka, differential rate of amylase synthesis.

グルコシド結合を有するマルトオリゴ糖によって誘導されることが判明した。グルコースにより α-グルコシダーゼの生産も抑制されるが、アミラーゼ生産とはややその感受性が異なるようである (Table 6)。

1-デオキシノジリマイシン (DNM) は α-グルコシダーゼ等の阻害剤として知られている¹⁷⁾。本 α-グルコシダーゼ活性に対する阻害効果を確認したところ, 1 mM DNM の添加で 90% 以上の阻害を受け, アミラーゼにはまったく作用しないことが確認された。もし G2 や可

Table 6. Effect of addition of glucose on Kg and Ka in feeding cultivation with maltose.

Glucose ^{a)} (%)	Kg ^{b)}	Ka ^{c)}
0	7.4 (100)	1.04 (100)
5	10.7 (145)	0.98 (94)
10	8.9 (120)	0.91 (88)
20	2.0 (27)	0.31 (30)
100	<0.1 (<1)	<0.01 (<1)

^{a)} Desired amount of maltose was replaced with glucose.

^{b)} Differential rate of α -glucosidase synthesis (mU/ml/absorbance unit). The value on maltose was taken as 100%.

^{c)} Differential rate of amylase synthesis (U/ml/absorbance unit). The value of Ka on maltose was taken as 100%.

Table 7. Effect of addition of 1-deoxynojirimycin on amylase production^{a)} at various stages of growth phase.

Addition ^{b)}		Growth ^{c)}		Amylase(mU/ml) ^{d)}	
Time(hr)	Phase	Before	After	Before	After
0	—	0.03	0.51	10	10
5	Mid-log	0.52	1.61	10	10
10	Late-log	1.60	1.81	20	30
15	Stationary	1.82	1.78	20	100

^{a)} Cultivations on 0.5% of maltose.

^{b)} 1 mM 1-deoxynojirimycin was added to the cultures at various stages of growth phase.

^{c)} O. D. at 660 nm.

^{d)} Amylase was measured at 5 hr after addition of above inhibitor.

溶性澱粉を用いたバッチ培養においてアミラーゼが生産されない原因が α -グルコシダーゼの作用により生じたグルコースによるものであれば、DNM の添加によってその活性を阻害すればアミラーゼの生産が期待されるはずである。すなわち、0.5% G2 を含むバッチ培養において終濃度 1 mM になるよう DNМ を菌の増殖の各時期に添加し、5 時間後のアミラーゼ活性を測定した (Table 7)。DNM を静止期直後に添加したときだけ 100 mU/ml のアミラーゼが生産され、その他の時期ではその効果は認められなかった。このことは α -グルコシダーゼがグルコースの生成を通してアミラーゼ生産を抑制している直接的な証拠であることを示した¹⁸⁾。

ラーゼ生産調節機構が明らかにされた。すなわち、 α -グルコシダーゼおよびアミラーゼのマルトオリゴ糖による誘導しかも α -グルコシダーゼの作用によって生じたグルコースによる両酵素のリプレッションによりアミラーゼの誘導される培養条件が結果的に制限され、 α -グルコシダーゼが本菌のアミラーゼ生産を制御する重要な酵素であることが明確にされた。

しかしながら、分子レベルでのアミラーゼ生産制御機構に関する情報はほとんど得られておらず、今後の研究課題として残されている。もし、それが解明されるならば、産業上有用な生澱粉分解酵素生産菌としての有効性を更に多方面で利用できるであろう。

おわりに

生澱粉分解酵素生産菌 *Bacillus circulans* F-2 のアミ

本研究は東京大学農学部農芸化学科生物化学研究室において実施された研究であり、ご指導いただきました

(故) 丸山 芳治名誉教授, 小野寺 一清教授, 農水省食品総合研究所食品資源部素材化技術研究室・谷口肇室長に御礼申し上げます。また, 本学会に投稿の機会を与えてくださいました編集委員の皆様方に感謝申し上げます。

文 献

- 1) O. E. STAMBERG and C. H. BAILEY : *Cereal Chem.*, **16**, 319-321 (1939).
- 2) R. M. SANDSTEDT and R. H. GATES : *Food Res.*, **19**, 190-199 (1954).
- 3) A. SUGIMOTO, K. ONISHI, T. TAKAYA and H. FUWA : *Denpun Kagaku*, **32**, 142-146 (1985).
- 4) H. TANIGUCHI, F. ODASHIMA, M. IGARASHI, Y. MARUYAMA and M. NAKAMURA : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2107-2115 (1982).
- 5) M. B. INGLE and R. J. ERICKSON : *Adv. Appl. Microbiol.*, **24**, 257-278 (1978).
- 6) N. E. WELKER and L. L. CAMPBELL : *J. Bacteriol.*, **86**, 681-686 (1963).
- 7) N. SAITO and K. YAMAMOTO : *J. Bacteriol.*, **121**, 848-856 (1975).
- 8) G. COLEMAN : *J. Gen. Microbiol.*, **49**, 421-431 (1967).
- 9) J. SEKIGUCHI, N. TANAKA and H. OKADA : *J. Bacteriol.*, **121**, 688-694 (1975).
- 10) J. L. MEERS and A. van LEEWENHOEK : *J. Microbiol. Serol.*, **38**, 585-590 (1972).
- 11) J. L. BOSTFORD : *Microbiol. Rev.*, **45**, 620-641 (1981).
- 12) H. TANIGUCHI and Y. MARUYAMA : *Denpun Kagaku*, **32**, 142-151 (1985).
- 13) Y. SAKANO, J. FUKUSHIMA and T. KOBAYASHI : *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2211-2216 (1983).
- 14) H. SATA, M. UMEDA, C. H. KIM, H. TANIGUCHI and Y. MARUYAMA : *Biochim. Biophys. Acta*, **991**, 388-394 (1989).
- 15) H. SATA, H. TANIGUCHI and Y. MARUYAMA : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2803-2809 (1986).
- 16) H. SATA, H. TANIGUCHI and Y. MARUYAMA : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1521-1527 (1987).
- 17) S. MARUO and S. MIGITA : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 219-225 (1980).
- 18) H. SATA, H. TANIGUCHI and Y. MARUYAMA : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3251-3280 (1987).

(平成 2 年 9 月 14 日受付, 受理)