ひげかびのアミラーゼに就て

高岡研一, 東尾方秋

(大阪大學産業科學研究所)

昭和24年6月6日受理

On the Amylase of *Phycomyces*

by

Ken-ichi TAKAOKA, Masatoki HIGASHIO

(Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

ひげかび *Phycomyces* は齋藤博士の分類⁽¹⁾に依ると、けかび *Mucor* 及び くものすかび *Rhizopus* と共に藻狀菌門の有孢子菌に屬し、菌學的には けかび に近い。ひげかびに就いては、吳研究室⁽²⁾で X 線的研究がなされ、又近年 K. BARNHARD 氏と H. ALBRECHT 氏⁽³⁾に依る生物化學的研究の報告がある。

然し ひげかび は醗酵工業的には重視されず、そのアミラーゼに關する報告も見受けられない。我々は此のひげかび が春先某酒精工場の倉庫に於て腐敗甘藷に異常によく成長するのを認め、醗酵原料に及ぼす影響を知るために次の如くそのアミラーゼに就て試験した。

實 驗 之 部

(I) ひげかび の培養に就いて

ひげかび は孢子囊柄が非常に長く、伸長 20 cm に及び、而も分岐せず、オリーブ色、金屬性の光澤を有し、接合孢子の柄の表面から鹿の角のような突起物が出て、夫が接合孢子を蔽っている。(Fig. 1) その培養に於て次の特性を認めた。

i) 孢子囊柄は明瞭に向日性を示す。

光を通さない恒温槽で培養すると發育遅く、槽外に於ては發育が旺盛で又明かに向日性を示す。

ii) 發生に際して時差的發芽をしない。

iii) 溫度感覺が鋭敏である。適温は 20°C 前後で、特に夏季の常温 30°C に近くなると發育中のひげかびは減衰し、孢子よりの培養も非常に困難である。

iv) 培養基：ひげかびは生甘藷の腐敗時に多く見受けられるが、腐敗甘藷の水分の多い間は繁殖せず、それが乾いた時分によく繁殖する。市村氏の檢鏡實習提要⁽⁴⁾には、“ひげかびは好んで3%の蔗糖液を以て潤せる麵麴によく發生す”とあり、吾々も麵麴にも發生させたが、その外餅粉、甘藷粉末、麴にも繁殖させた。麴の 5~6 日間培養させたものがアミラーゼ力強大である。又麴の場合、良質のものより寧ろ粗い麴の方が發生がよく、水分は麴 20g に對して水 15cc 位のものが最適である。

(II) ひげかびのアミラーゼの有無の検討

培養基として餅粉(α-糯米澱粉)を水で練つただけのものを用い、ひげかびを發芽させ、2 日間隔の直接糖分、殘澱粉價を BERTRAND 氏法にて定量し、分解緩慢ではあるが、アミラーゼを有することを明かにした。

直糖 水を加えて數時間浸出し、よく振盪後、溶出せる糖量を BERTRAND 氏法にて定量す。

殘澱粉價：水を加えて溶出する直糖を除き、稀鹽酸で加水分解して、BERTRAND 氏法にて還元糖を葡萄糖として測定し、0.9 を乗じて殘澱粉價を計算す。(Table 1 参照)

(III) ひげかびのくものすかび・けかびに對するアミラーゼの比較試験

Fig 1.
Slant Culture
of *Phycomyces*.

Table. 1.

Time of Cultivation (days)	Soluble Sugar (%)	Residual Starch Value
0	0.0	59.5
2	0.0	59.2
4	1.1	58.9
6	6.6	53.0

ひげかびのアミラーゼを同じ藻状菌門のくものすかび, けかび
○ アミラーゼと比較するために, 岡崎氏⁽⁵⁾のくものすかび, けか
びのアミラーゼ試験に則して, 以下の試験を行った。

i) 培養: 麩 20 g と水 15cc の培養基に, 常法の如く植菌後,
室温にて 4~6 日間培養する。

ii) 酵素液: 上の如く培養したものに, 蒸留水 200 cc を加え,
トルオール 1% 添加のもとに 15~18 時間冷温にて酵素の抽出をな
し, 濾紙にて濾過し, その濾液を酵素液となす。

iii) 酸熱処理酵素液: 酵素液 25cc を $N/10$ HCl にて $pH=2.6$ とし, $40^{\circ}C$ にて 30 分保ちたる後, $M/5$
 Na_2HPO_4 にて $pH=6.0$ に戻し, 之を正確に 50cc に満す。

酸熱処理酵素液に依つて β -アミラーゼの有無を試験す。

iv) アミラーゼ作用の配合と定量

2%可溶性澱粉液	普通處理 100cc	酸熱處理 100cc
McIlvaine 緩衝液($pH=4.8$)	10cc	10cc
酵 素 液	10cc	
酸 熱 處 理 酵 素 液		20cc
蒸 溜 水	10cc	
ト ル オ ー ル	少量	少量

$30^{\circ}C$ に於て, 所要時間毎に試料を採取し, 沃度反應並びに還元力を測定する。

v) 沃度澱粉反應の測定: 試験管に 2~8 cc の蒸留水を入れ, $N/100$ I-KI 液を 1 滴添加し, 之に上記の作
用混液を 0.1~0.5cc 注下し, その色調を見る。

vi) 還元力の測定: 作用混液 2cc をとり BERTRAND 氏法にて定量し, 最初の混液を酸糖化したものを同
様定量して得た値に對する%を以て分解率とした。なお此の還元力は, 岡崎氏の報告と比較するため, 葡萄糖と
して算出した。

A. 沃度澱粉反應と還元力の關係

以上の方法に依り沃度反應の變化と分解率との關
係を見ると, 左の如く酸熱處理の有無に依つて著し
い差違を示す (Table 2 参照)。

即ち, 酸熱處理に依つて殆んど還元糖を生成しなく
なる。従つて ひげかび には恐らく β -アミラーゼが
存在しないのであらう。

Table. 2.

Iodine Reaction	Normal Enzyme Solution		Attacked Enzyme Solution	
	Decomposition rate	Time	Decomposition rate	Time
Violet	12~18%	3~6hrs.	7~8%	2~3days
Red	35~39 "	20~24 "	10 "	20~30 "
Yellow	79 "	2.5 days~	25 "	55 " ~

Table. 3. Decomposition Rate by Maltase

Time	Phycomyces		Rhizopus		Mucor	
	Normal Enzyme Solution	Attacked Enzyme Solution	Normal Enzyme Solution	Attacked Enzyme Solution	Normal Enzyme Solution	Attacked Enzyme Solution
0hr.	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2.5hrs.			20 "		23 "	
3 "	0 "					
3.5 "			30 "			
5 "					45 "	
6 "		0 "	50 "	5 "		
21 "					65 "	
1 day	20 "	0 "				10 "
3 days	29 "					
5 "	41 "	5 "				

B. マルターゼ作用の測定

実験方法 iv の 2% 可溶性澱粉液の代りに, 2% 麦芽糖液を用いて, 還元力の測定を行い, その増加糖量を%で表示し, くものすかび・けかびのそれと比較した結果は上の通りである。(Table. 3. 参照)

即ち, ひげかびのマルターゼ作用は, 矢張り緩慢で, 而も酸熱處理に依りその作用は消失し, くものすかび・けかび同様非抵抗性マルターゼである。

C. 菌分離直後の異常作用

Table. 4.

Iodine Reaction	Normal Enzyme Solution		Attacked Enzyme Solution	
	Decomposition rate	Time	Decomposition rate	Time
Violet	Blue-Violet 3~12%	0.5~48hrs	6 %	24 hrs
Red			10 //	48 //
Yellow			26~28 //	2.5~3days

ひげかびの菌を腐敗甘藷より分離した直後のものは, 麩に培養したものの通常作用と異り, そのアミラーゼ作用力は極く弱く, 且つ酸熱處理に依つても分解率は殆ど變化しない。則ち甘藷より分離直後は, 殆ど β -アミラーゼのみを含むという異常作用を示す。(Table. 4. 参照)

此の事は最近の BALIS⁽⁶⁾ 氏等の甘藷より結晶状 β -アミラーゼ分離の報告, 或は中原光子氏⁽⁷⁾ の“甘藷の成育期には比較的 α -アミラーゼが強いのである

が, 成熟後貯藏中に β -アミラーゼを強力にする”という報告と關聯して興味ある事實と考えられる。

以上に依り見出し得た ひげかび の法則性を くものすかび・けかび と共に要約すると, 次圖の如くなる。

Fig 2. Amylolytic Power

即ち, くものすかび・けかびは澱粉分解率 50~60% に至るまで, 殆ど一樣な急昇曲線を示すが, ひげかびは緩慢であり, 一般に分解速度は小である。又沃度反應と分解率との關係は沃度反應の赤の點がくものすかびは 40% けかびはやや早く 35% 附近であるのに比して, ひげかびは 35~39% 附近で, ほぼ同一であるが, 紫の點は 12~18%, 黄の點は 81% で他の 2 者の紫の點 4%, 黄の點約 55% に比し, 何れも著しく還元糖が増した後に初めて沃度反應の變色が起ることを示している。

結 論

(1) ひげかびは くものすかび・けかび同様 α -アミラーゼと非抵抗性マルターゼとを有するが, その反應速度は極めて緩慢である。之が ひげかび が實用に供されない理由であらう。

(2) ひげかびの菌を腐敗甘藷より分離した直後のものは, そのアミラーゼ作用力が極く弱く, 而も殆ど β -アミラーゼのみを含むという異常作用を呈することを認めた。

終に臨み, 御懸篤なる御指導を賜つた二國二郎教授に厚く感謝の意を表する。又阪大工學部小田雅夫助教授並びに東大農學部岡崎浩農學士の御教示に對し深謝する。

本研究結果は昭和 24 年 1 月 22 日, 日本農藝化學會關西支部第 64 回例會に於て報告した。

(1) 齋藤賢道: 醱酵菌類檢索便覽, p. 4.

(2) 吳, 中村, 永田 農化, 14, 150 (1938).

- (3) K. BERNHARD & H. ALBRECHT: *Helv. physiol. pharmacol. acta*, **3**, C32~3 (1945).
- (4) 市村 塘 顯微鏡實習提要, p. 113.
- (5) 岡崎 浩 日本農藝化學會(昭和23年4月18日東京)にて發表.
- (6) BALIS, THOMPSON & WALDEN: *J.B.C.*, **2**, 163 (1946).
- (7) 中原光子: 栄養食糧學會(昭和23年5月2日京都)にて發表.

Summary

The amylolytic power of *Phycomyces* was examined as compared with that of *Rhizopus* and *Mucor*. The normal koji-culture of *Phycomyces* has weak α -amylase and maltase but has no β -amylase. But on the contrary, the fresh culture of *Phycomyces* separated from putrefied sweet potato has β -amylase alone and has no α -amylase.