綜 括

我々は第 1 報に依り大豆油の penicillin 生産に著しい影響を見たのでその培養中の化学的變化を分析し次の結果を得た。

1. L.C 培地 (lactose 単用) に於いては 48 時間に於いて $\text{NH}_3\text{-N}$ level が peak である。
 2. L.C 培地に於いても他の炭素源を混用すれば、この peak が消失するか、又は著しく低くなる。
 3. 自己消化区と然らざるものとは分析値に判然と區別出来る。
 4. 培地中の Fe は菌體中に移行する。又、大豆油添加に依り葡萄糖単用区を除き total acidity は増加した。
- 以上の結果に依り $\text{NH}_3\text{-N}\%$ の分析に依り大豆油添加に依る影響が推定出来る事がわかる。
- 終りに際し御指導頂いた中川薬品課長、力價検定して頂いた西川渉君に厚く感謝申上ます

(1) H. KOFFER, R. L. EMERSON, *et al.* : *J. Bact.*, 50, 517~548 (1945).

Summary

A remarkable effect of soybean oil on the penicillin production had been reported in Part 1, and we analyzed chemical changes during fermentation and obtained following results.

1. In the L.C. medium (lactose only), $\text{NH}_3\text{-N}$ level reached the peak at 48 hours.
2. The above mentioned peak disappeared or was remarkably low even in the L.C. medium, if other carbon sources were used therewith.
3. A distinguished difference between autolyzed and non-autolyzed groups was revealed in analytical data.
4. Iron contained in the culture medium was transferred into the organisms. Addition of soybean oil increased the total acidity in the media except in the case when glucose was used as a sole C-source.

From the findings described above, the effect of addition of soybean oil can be estimated based upon the analytical data of $\text{NH}_3\text{-N}\%$.

各種糸状菌のアミラーゼに関する研究 (第 4 報)

糸状菌アミラーゼの糖化の伸びに對する α -アミラーゼの影響に就て*

岡 崎 浩** (東大農學部農藝化學科醗酵學研究室)

昭和 26 年 2 月 20 日 受理

Studies on Amylases of Various Species of Molds. Part 4. Effect of α -Amylase upon the Fermentable Sugar Production Rate of the Secondary Phase of Hydrolysis by Mold Amylase Systems.

by Hiroshi OKAZAKI (Lab. of Fermentation, Dept. of Agric. Chem., Univ. of Tokyo, & Takamine Lab. in Sankyo Co. Ltd.)

筆者は第 2 報⁽¹⁾における 5 つの型の糸状菌アミラーゼの醗酵性糖分生成曲線の相違に着目し、その理由は、これら糸状菌の α -アミラーゼと β -アミラーゼの含有比率の相違によるものではないかと推論し、これを證明するために第 3 報⁽²⁾において、從來までよく作用機構が解明されている大麥の α -と β -アミラーゼをそれぞれ純化した。その混合比率を種々かえて糖化の伸びに差違を生ずるか否かを檢したところ、その間に何等差を認めえなかつた。そこで上記の推論は、すくなくとも糸状菌が大麥をはじめ從來までよく知られている α -, β -アミラーゼと同じ作用機構のものを有すると考える限り否定せざるを得ないことになった。しかし乍ら、こゝに慎重な考察を必要とする。すなわち、糸状菌の α -アミラーゼは CALDWELL 等⁽³⁾の示す糖化曲線の性状から推察して一應、大麥の α -アミラーゼと同一の作用機構を有するものとしうが、糸状菌の β -アミラーゼは結晶化も未だなされ

* 本稿の要旨は昭和 26 年 1 月 27 日の日本農藝化學會關東支部例會にて口演した。

** 三共株式会社高峰研究所東大派遣研究員。

ず、又徳岡氏の“マルターゼを伴う β -アミラーゼ”(4)、北原氏等の“ γ -アミラーゼ”(5)、又 J. CORMAN の“Glucogenic enzyme system”(6)等の如く、たしかに糊精化力はなく、糖化作用を主反応とする β -アミラーゼ様酵素の存在は認められていながら(筆者が今まで糸状菌の“ β -アミラーゼ”と稱して来たのも單にこの意味からである)、どうやら従來の大麥、甘藷等の植物性 β -アミラーゼとは作用機構のことなるものであるらしいことが豫想される。

かくして若しそうだとすれば、第3報における、 α と β の比率の相違によつて糖化の伸びが左右されないという大麥を用いた場合の結果は、糸状菌の場合にはあてはまらないかも知れないという希望的觀察に到着した。そこで筆者は本報告において糖化の伸びのよい型の糸状菌の原酵素液に α -アミラーゼを添加したところ著しく糖化の伸びが悪くなることをみとめ、又糖化の伸びの悪い型の糸状菌の原酵素液から α -アミラーゼを一部除去することによつて明に伸びが良くなることを認め、糸状菌においては α -アミラーゼと β -アミラーゼ様酵素の含有比率によつて糖化の伸びが左右されることを結論した。しかして大麥アミラーゼの場合との矛盾に對して、主として、糸状菌の β -アミラーゼ様酵素が従來の β -アミラーゼとはその澱粉分解作用機構上の性質において別個のものであろうことを推論したのである。

實 驗 方 法

(I) 糸状菌アミラーゼの原酵素液： 何れも第2報と同じもの。

(II) 添加用 α -アミラーゼ： 第3報の原 α -アミラーゼ液と同じもの。

(III) α -アミラーゼ添加實驗： 先ず糖化の伸びの良い *Asp. Usamii* 及び *Rhiz. tonkinensis* の原酵素液に夫々 α -アミラーゼを添加して $R(\alpha/\beta)$ を大にした。作用配合と α -, β -アミラーゼ量及び $R(\alpha/\beta)$ の値はそれぞれ次のようになる。

Asp. Usamii (R15-0635): Original Enz. Soln.*¹ 10 ml + Original α -Amyl. Soln. 7 ml

(32 α + 103 β)

(70 α)

$$\therefore R(\alpha/\beta) = 102 \alpha / 103 \beta \approx 1/1$$

Rhiz. tonkinensis (R 6-4): Original Enz. Soln.*² 10 ml + Original α -Amyl. Soln. 7 ml

(30 α + 98 β)

(70 α)

$$\therefore R(\alpha/\beta) = 100 \alpha / 98 \beta \approx 1/1$$

これら二酵素混液を何れも 2% Sol. Starch 100 ml と MCLVAINE Buffer (pH 4.8) 10 ml に加え蒸溜水を追加して正確に合計 130 ml になるようにして 30° で作用させた。定量法は第2報に同じ。

(IV) α -アミラーゼ除去實驗： 逆に、糖化の伸びの悪い型の *Asp. awamori* (BL 5-9)³ の原酵素液を pH

Fig. 1: Effect of α -Amylase upon the Rate of Fermentable Sugar Production of Mold Amylase System.

*¹: $R(\alpha/\beta) = 1/3.2$

*²: $R(\alpha/\beta) = 1/3.3$

2.5, 40°, 30 min. の処理を行つて主として α -アミラーゼの大部分を破壊し、原容の 2 倍にしたものを處理

Table 1. Effects of α -Amylase (addition or elimination) upon Fermentable

Sugar Production of Mold Amylase Systems.

Reaction time	Rg.	Fermentable Sugars			Dextrins			Original Enz.
		Starch converted to Glucose%	Starch converted to Maltose %	Starch conv. to Tot. ferm. sug. %	Reduc. Dext. as % of theor. Maltose	% of Tot. dext. by weight	Aver. Degr. of polym. of Dextr.	Soln. Tot. ferm. Sugars%
[A] <i>Asp. Usamii</i> (R 15-0.635) + α -Amylase								
30 min.	17.2	4.0	4.9	8.9	21.5	91.0	8.5	11.2
60 "	27.6	9.6	9.0	18.6	28.2	81.4	5.8	67 min. 23.8
90 "	—	—	—	—	—	—	—	95 " 33.0
2.0 hrs.	39.5	16.4	15.5	31.9	30.9	68.1	4.4	40.2
3.0 "	—	—	—	—	—	—	—	55.9
4.0 "	52.7	31.6	12.5	44.1	29.8	55.9	3.8	—
5.0 "	—	—	—	—	—	—	—	69.0
6.0 "	59.3	42.4	7.6	50.0	26.4	50.0	3.8	—
8.0 "	—	—	—	—	—	—	—	78.0
9.0 "	67.1	54.7	—	54.7	25.6	45.5	3.5	—
12.0 "	—	—	—	—	—	—	—	84.5
Iodine-starch-reaction, Achrom. pt : 45 min.								140 min.
[B] <i>Rhiz. tonkinensis</i> (R 6-4) + α -Amylase								
30 min.	18.7	5.9	9.9	15.8	15.7	84.2	10.8	10.8
60 "	30.1	9.9	17.9	27.8	22.5	72.3	6.4	21.4
90 "	—	—	—	—	—	—	—	33.3
2.0 hrs.	—	—	—	—	—	—	—	44.4
2.5 "	49.3	23.1	22.9	46.0	29.3	54.1	3.7	53.4
3.0 "	—	—	—	—	—	—	—	61.8
4.0 "	57.1	34.8	18.3	53.0	26.2	47.0	3.6	71.0
5.0 "	—	—	—	—	—	—	—	75.6
6.0 "	63.3	45.1	13.0	58.1	23.2	41.9	3.6	—
8.0 "	—	—	—	—	—	—	—	85.3
8.5 "	68.0	52.9	10.0	62.9	20.0	37.1	3.7	—
Iodine-starch-reaction, Achrom. pt. : 50 min.								150 min.
[C] <i>Asp. awamori</i> (BL 5-9) attacked.								
15 min.	—	—	—	—	—	—	—	4.1
30 "	—	—	—	—	—	—	—	8.9
45 "	—	—	—	—	—	—	—	14.6
60 "	—	—	—	—	—	—	—	21.9
90 "	—	—	—	—	—	—	—	31.7
2.0 hrs.	—	—	—	—	—	—	—	39.0
3.0 "	19.5	14.4	8.4	22.8	2.0	77.2	78.4	48.4
5.0 "	—	—	—	—	—	—	—	53.7
6.0 "	39.4	29.0	13.1	42.1	8.1	57.9	14.3	—
8.0 "	—	—	—	—	—	—	—	56.1
9.0 "	55.0	43.5	14.0	57.5	7.1	42.5	11.9	—
12.0 "	61.4	52.4	13.3	65.7	4.7	34.3	14.6	58.6
Iodine-starch-reaction, Achrom. pt. : 7.5 hrs.								41 min.

素液としてその糖化の伸びをみた。作用配合は、2% Sol. St. 100 ml + McILVAINE Buffer. (pH 4.8) 10 ml + 処理酵素液 20 ml, 30° 作用、定量法は前に同じ。

この配合に於ける α 、 β -アミラーゼの含有量を第 1 表の結果から第 2 報の筆法によつて算出すれば、 $[10\alpha + 26\beta]$ 、すなわち、 $R(\alpha/\beta) = 10\alpha/26\beta \approx 1/2.6$ となる。原酵素液は 1/0.74 である。

實 験 結 果

第 1 表 [A], [B], [C] に示す。各欄の説明は第 2 報に準ずる。尙、最後欄に比較の便宜のため原酵素液の酸酵性糖分生成経過⁽¹⁾、ならびに沃度反應無色點を附記した。

又第 1 圖には、酸酵性糖分のみを原酵素液と比較して書いてある。

考 察 ならびに 總 括

(I) 以上の結果によつて知られる通り、糸状菌のアミラーゼ系に α -アミラーゼを添加するか、又は逆に α -

アミラーゼの一部を除去するかして α -アミラーゼと β -アミラーゼ様酵素の含有比率を変えると、その酸酵性糖分生成の伸びが著しく左右されるのである。すなわち、比率を大にすれば伸びが悪く、小にすれば伸びがよくなるのである。この実験によつて筆者が第 2 報の考察の部に述べた各型の糸状菌の糖化の伸びの良否は $R\left(\frac{\alpha}{\beta}\right)$ に左右されるものであるという推論は一應證明されたわけである。

(II) 更に、第 3 報に示したとおり、大麥の α 、 β -アミラーゼを用いた実験においては、兩者の比率を変えても糖化の伸びには何等差違が認められなかつたのであつて、糸状菌の場合はこれと明に事態を異にする。この矛盾に對して筆者は主として、糸状菌の β -アミラーゼ様酵素が從來の植物性 β -アミラーゼとは分解作用機構上の性質が異なるものであらうと結論したい。

こゝにその作用機構に對して、筆者が今までのすべての実験結果をも考合しつゝ與えている若干の推定を記載すべきであるが、ひきつゞく実験研究の推移によつて逐次明確になり次第報告するであらう。

尙、別途の研究方法によつて提唱されつゝある前掲北原氏の、“ γ -アミラーゼ” は筆者の所論を裏書きする若干の報告のうち、最新且つ、最も具體的なものとして將來の一致を希求するものである。

たゞ、その間の事情が明確になるまでは“ γ ”との混同を避け、且つ又、旋光性に準據する α 、 β 等の定義を一應無視し、單に β に似て非なるものとして、“ β' -アミラーゼ” の名稱を用いて今後の報告を記載することを諒承されたい。これは又、記述の便宜上からでもある。

以上の實驗は現在、東大農學部坂口研究室において行つていゝもので、坂口謹一郎教授をはじめ、朝井勇宣教授、又、生物化學研究室の丸尾文治、小林恒夫の諸兄の御教示に對し深く感謝いたします

- (1) 岡崎：農化，25，201(1950)。
- (2) “：日本農藝化學會東京支部例會，1951-1-27 にて口演：農化，25，224 (1951)。
- (3) M. L. CALDWELL *et al.* ; *J. Biol. Chem.*, 161, 361, 1945 ; 171, 667, 1947。
- (4) 徳岡：農化，13，586，1937。
- (5) 北原，久留島：醸工雜，27，254，1949。
- (6) J. CORMAN, A. F. LANGLYKKE : *Cereal Chem.*, 25, 190, 1948 ; *c.f. Chem. Abst.*, 42, 5610, 1948。

Summary

As previously reported by the author, amylase systems of *Asp. oryzae*-Type (A) and *Asp. awamori*-Type (B) convert starch to fermentable sugars up to 40~50% and further hydrolysis are very slow, on the contrary, *Asp. Usamii*-Type (C), *Rhiz. tonkinensis*-Type (D) and *Rhiz. Peka*-Type (E) produce fermentable sugars up to 80~90% smoothly.

He discussed there the reason of this difference and suggested that this would be due to the different ratios of α -, and β -amylase contents of these 5-types of mold amylase systems.

The present report shows that this speculation is correct. Smooth fermentable sugar production that are revealed by (C) or (E) are apparently inhibited by the addition of α -amylase to each original enzyme system, and the slow rates of fermentable sugar production of secondary phase of hydrolysis that are revealed by (A) or (B) are apparently changed to smooth curves by partial elimination of α -amylase from each original enzyme system. (Tab. I, Fig. I).

In the case of mold, therefore, it seems to be reasonable to conclude that the rate of fermentable sugar production of secondary phase of hydrolysis depends upon the ratio of α -, and β -amylase.

While, as shown previously by the author, the facts was not observed in the case of barley α -, and β -amylase. Since the mechanism of starch degradation of α -amylase in mold and barley are generally accepted to be identical, we must inevitably conclude that the so-called “ β -amylase” in mold is not identical with that of barley.

One of the reasonable speculations is that the β -amylase-like enzyme in mold has less affinities to the lower dextrans which are produced by α -amylase jointed.

Consequently, he shall propose to designate the peculiar enzyme, as “ β' -amylase”. (However, this designation is only for the convenience of the distinction from barley β -amylase, and so, more reasonable designation shall be given later).