酵素による澱粉のヨード反応反転現象に就て (第9報)

Aspergillus candidus var. *amylolyticus*

アミラーゼ [α -型] の精製結晶化

高岡 研一 (大阪大学産業科学研究所)

昭和27年9月6日受理

The Reversion of Starch-Iodine Color Reaction caused by an Enzyme. Part. 9.

Crystallization of Amylase [α -type] of *Aspergillus candidus* var. *amylolyticus*.

By Ken-ichi TAKAOKA (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

緒 論

Aspergillus candidus var. *Amylolyticus* は著者が所謂ヨード反応反転現象を発見⁽¹⁾した際に、酵素の生産菌として使用した糸状菌である。この菌の α -型アミラーゼの精製を試みていたが、今回赤堀等の方法⁽²⁾に従つてその結晶化に成功したのでここに報告する。

尚糸状菌のアミラーゼの精製に関しては、既に UNDERKOFER 等⁽³⁾, FISHER 等⁽⁴⁾⁽⁵⁾, 及び赤堀等⁽²⁾が何れも *Aspergillus oryzae* の培養液或いはその沈澱物から α -型アミラーゼの結晶化に成功している。

Aspergillus candidus var. *amylolyticus* は菌叢色が純白色で、老成すればやや黄色を帯び、他の *Aspergillus candidus* 菌に比べるとその菌叢が疎生で老成後の帯黄色の度が強い。その生産する酵素はヨード反応消失力及び澱粉糖化能力が極めて強い⁽¹⁾。

この菌の麩麹浸出液から得た結晶酵素液を甘藷澱粉糊液に常温、pH=4.8 で作用させると、粗酵素液で行つたと全く同様の所謂ヨード反応反転現象⁽⁶⁾を再現する。

即ち、澱粉のヨード反応反転現象に関与した酵素は、予想通り⁽⁷⁾⁽⁸⁾ *Aspergillus candidus* var. *amylolyticus* のアミラーゼ [α -型] であることを確認した。

実 験 の 部

(1) α -型アミラーゼの結晶化 新鮮穀20gを500cc容のフェルソバツハのフラスコに水24ccと共にとり、煮沸間断殺菌後、純菌の1白金耳を植付け、よく振つて30°に4日間培養する。穀は白色の菌叢に被われる。之に蒸留水200cc及びトルオール2ccを加え、時々振盪しながら18時間室温においた後、濾紙で残渣を除き、褐色透明液(1個180~185cc)を15個分総計2750cc集める。この液のアミラーゼ力は、還元力を LEHMANN-SCHOORL 法で測定して求める WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法で A. E. = 0.154/cc である。この液を 5N NaOH で pH=7.0 に保ち乍ら、1M 醋酸カルシウム液を原液の $\frac{1}{10}$ 量(275cc)滴加して、生じた沈澱を吸引濾過すると透明微黄色の濾液を得る。浴温40°位で減圧濃縮し、約200ccとする。次に、多量の Ca^{++} を除去するために一夜水道流水で透析した後、約 $\frac{3}{4}$ 飽和になる様に固体の硫酸を加える。数時間後生じた沈澱を集め、濾紙と共に少量の水に溶かして後濾過する。この褐色透明濾液に再び固体の硫酸を加えて、約 $\frac{3}{4}$ 飽和とする。生ずる沈澱を濾紙上に集め、約50ccの水に溶かして水道流水で2夜透析する。以下赤堀等の方法⁽²⁾に従い、透析内液に1%のアクリノール水溶液を加え、最初に生ずる少量の粘稠な黄褐色沈澱を捨て、上澄液に最早沈澱が生じなくなる迄アクリノール液を添加する。斯して生じた美しい黄色沈澱を遠心分離して集め、30cc

Fig1. Cubic-shaped crystals of the amylase [α -type] of *Aspergillus candidus* var. *amylolyticus*. ($\times 400$).

の $M/2$ 醋酸緩衝液 ($pH=6.0$) に溶解し水でよく洗滌した酸性白土を加えてアクリノールを吸着せしめ遠心分離すると、無色透明の上澄液を得る。この上澄液に約同量のアセトンを加えて生ずる酵素の沈殿を遠心分離して集め、之を約 4cc の $M/100$ 醋酸カルシウム液に溶解し (この溶液は最初の抽出酵素液の約 100 倍の力価をもつ)、不溶物を濾去した後、更にアセトンを徐々に滴加して僅かに濁る程度 (約 35% アセトン濃度) とし冷蔵庫中に放置する。初めに微量析出する無定形の沈殿を除去し (この無定形の沈殿をよく取り除く程、後の結晶化がよく行われる)、毎日数滴の冷アセトンを追加して冷蔵庫中に放置すると、数日後大形の美しい無色板状結晶を生じ (Fig. 1 参照)、日を経るにつれて増加成長する。約 10 日後アセトン濃度は約 50% となり、結晶の析出は大体完了する。 (この酵素結晶懸濁液の A. E. = 5.388/cc, 上澄液の A. E. = 3.221/cc)。之を遠心分離し、アセトンで洗つて乾燥すれば、白色粉末 34.5mg を得る。之のアミラーゼ力は 1% 酵素溶液で A. E. = 5.460/cc である。尙この結晶を取り除いた母液にアセトンを極く少量追加して冷蔵庫中に放置すると、再び前と約同量の無色板状結晶が析出した (この酵素結晶懸濁液の A. E. = 1.760/cc, 上澄液の A. E. = 1.468/cc)。

(2) *Aspergillus candidus* var. *amylolyticus* アミラーゼの [α -型] 確認 次の如くデキストリン溶液に結晶酵素液を作用させて旋光変を測定し、分解生成物の変旋光を検討した⁽⁹⁾。

5.5% デキストリン (武田薬品製) 溶液	90.0cc	} の混合液に結晶酵素液 (A. E. = 0.132/cc) 3.0cc を加え、計 100cc (基質濃度が 4.95%) とし、20~21° の室温で酵素作用を進行させる。その加水分解度は各時間後の還元糖量を FEHLING-LEHMANN-SCHOORL 法で測定しマルトースとして計算した。
0.5M 醋酸緩衝液 ($pH=5.0$)	4.0cc	
蒸留水	3.0cc	

Table. 1. Progress of Reaction and Mutarotation of Reaction Mixture when Dextrin was degraded by Crystalline Amylase of *Aspergillus candidus* var. *amylolyticus*.

Time	Optical rotation (angular degree)			Reducing power (mg maltose/cc)		Conversion %	Color with iodine
	before mutarotation	after mutarotation	mutarotation	before mutarotation	after mutarotation		
	α_D	$\alpha_{D'}$	$\alpha_{D'} - \alpha_D$				
0 min.		17.40*	—	—	—	0	red
10 mins.	17.29	17.16	-0.13	2.15	2.85	5.2	red
30 mins.	17.24	17.03	-0.21	4.95	5.10	9.3	{reddish brown
60 mins.	16.99	16.77	-0.22	7.80	7.80	14.2	{brownish yellow
24 hrs.	15.14	15.15	+0.01	—	19.70	35.8	colorless

Experimental value obtained in 30 secs. after addition of enzyme.

** Reducing power attributed to the substrate dextrin was deducted.

*** Calculated from mg. maltose of reaction mixture after mutarotation.

即ち、デキストリンを加水分解して負に変旋光を示す分解物則ち α -配位の分解物を生成する。依つてこの結晶酵素は α -型のアミラーゼである。

(3) *Aspergillus candidus* var. *amylolyticus* の結晶アミラーゼ [α -型] 溶液のマルターゼ力試験 次の如く、マルトース溶液に結晶酵素液を作用させて還元力の増加を測定した。

3.0% マルトース溶液 9.3cc ; 0.5M 醋酸緩衝液 ($pH=5.0$) 0.4cc の混合液に結晶酵素液 (A. E. = 0.132/cc) 0.3cc を加え、計 10cc とし 30° で作用させ、各時間毎にその 2cc をとり FEHLING-LEHMANN-SCHOORL 法で還元力を測定し、盲試験との差を $N/10$ 及び $N/20$ $Na_2S_2O_3$ の cc 数で表わしたのが次表である。

Table. 2. Examination for Maltase

Time	$Na_2S_2O_3$ (cc).	
	$N/10$	$N/20$
0 hr.	10.08	20.15
1 hr.	10.07	20.10
18 hrs.	10.09	20.18
24 hrs.	10.13	20.25

還元力の増加は全く認められず、この結晶酵素液にはマルターゼは存在しない。

(4) A. E. の測定 還元力を LEHMANN-SCHOORL 法で測定した WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法の A. E. で示す。

基質 可溶性澱粉糊液 $N/10$ 醋酸緩衝液 ($pH=5.2$) = 2 : 1 で作成するのであるが、この液 20cc に酵素液 2cc を加えた際に

澱粉濃度が1%になるように、可溶性澱粉の水分を計算に入れて基質を作成する。

酵素液：試験すべき原液の儘か、或いは何倍かに希釈して使用する。

測定：基質澱粉糊液 20cc に酵素液 2cc を加え 37° で 10 分間反応せしめた後、FEHLING B 液（アルカリ液）5cc を加えて反応を止め、FEHLING A 液（銅液）5cc を加えた後、3 分間以内に沸騰する様加熱して 4 分間沸騰せしめ、25° まで急冷した後、KI 1.5g を含んだ水溶液 5cc と 25% H_2SO_4 5cc を加えて、 $N/20 Na_2S_2O_3$ 溶液で滴定する。盲試験として酵素液の代りに水を用いて同様の操作を行い、その差をとる。次に $k = -\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ より k の値を算出して、これに希釈倍数を乗じて A. E. の値とした。

但し、a = 澱粉の初濃度をマルトース量で表わしたもの。

$x = t$ 分後作用液を定量して得たマルトース量。

(5) 結晶酵素液による所謂ヨード反応反転現象を観察 結晶酵素溶液 (A. E. = 0.027/cc) 5cc を 1% 甘藷澱粉糊液 (pH = 4.8 の酢酸緩衝液 5cc を含む) 50cc に加えて常温 (室温 22°) で作用させるとヨード反応青より紫、赤、褐色と褪色するが約 25 分でヨード反応の反転後の青色が認められた。

総 括

Aspergillus candidus var. *amylolyticus* アミラーゼ [α -型] の精製結晶化に成功した。又その結果、所謂澱粉のヨード反応反転現象に関与した酵素が [α -型] のアミラーゼであつたことを確認した。

終りに臨み、終始御懇篤な御指導を賜つた二国二郎教授に厚く感謝の意を表する。又本酵素のデキストリンに対する分解型式を測定して頂いた不破英次学士に深謝する。尙本研究費の一部は文部省科学研究費に仰いだ。

- (1) 高岡研一 農化, 23, 56, (1949)
- (2) 赤堀四郎, 萩原文二, 池中徳治 *Proc. Japan Acad.*, 27, 350, (1951)
- (3) L. A. UNDERKOFER, D. K. ROY *Cereal Chem.*, 28, 18, (1951)
- (4) K. H. MEYER, R. DE MONTMOLLIN, Ed H. FISCHER *Chimia*, 5, 65, (1951)
- (5) Ed H. FISCHER, R. DE MONTMOLLIN *Nature*, 168, 607, (1951)
- (6) 二国二郎, 高岡研一, 不破英次: 農化, 25, 37 (1951)
- (7) 高岡研一: 農化, 23, 390, 528, (1950)
- (8) 二国二郎, 不破英次, 高岡研一 農化, 25, 71, (1951)
- (9) 二国二郎, 不破英次 *Proc. Japan Acad.*, 28, 139, (1952); 農化, 26, 154, (1952)

Summary

34 mg (dry weight) of crystalline amylase was obtained from 2750 cc of a raw culture medium of *Aspergillus candidus* var. *amylolyticus*, and it was confirmed as the amylase [α -type] by the measurements of the rotatory power of the fission products.