case of symbiosis of lactic acid bacteria. As this reason, we have considered that increase of acidity in cheese curd gives desirable effects on the growth of *P. roqueforti*. In order to obtain the obvious knowledges about this, we have performed the following experiments:

- 1) On the consumption of glucose, galactose and lactose in synthetic media as the carbon source of *P. roqueforti*.
- 2) On the effects of symbiosis of *Str. lactis* on the consumption of lactose by *P. roqueforti* and its growth.
- 3) On the changes of acidity and amount of lactic acid in skimmilk media by *P. roqueforti* and *Str. lactis*.
- 4) On the availability of lactic acid by *P. roqueforti* as carbon source.

From the results obtained from these experiments, we have considered as follows:

Lactose is almost not consumed by *P. roqueforti*, as compared with glucose or galactose. But in the case of symbiosis of lactic acid bacteria, lactose is remarkably consumed. This is owing to the following effects:

- 1) Lactose is consumed by lactase secreted from lactic acid bacteria and results in glucose and galactose which are more easily consumed by *P. roqueforti*.
- 2) Lactose is also hydrolysed by lactic acid produced from lactose and gives same effects as 1) on the consumption of lactose by *P. roqueforti*.

Lactic acid is consumed by *P. roqueforti* as in the case of volatile fatty acids. In the case of cheese, the pH value of cheese curd in the period of ripening depends upon the amounts of these acids and bases produced from milk proteins by *P. roqueforti*.

各種糸状菌のアミラーゼに関する研究 (第 10 報)

麹菌糖化酵素のアミラーゼ作用とマルターゼ作用について (その 1)*

岡 崎 浩 (三共株式会社高峯研究所)

昭和 29 年 11 月 8 日 受理

Studies on Amylases of Various Species of Molds. Part 10. Amylase and Maltase Actions of Saccharogenic Amylase of *Aspergillus oryzae*. (1)

By Hiroshi OKAZAKI (TAKAMINE Research Laboratory, Sankyo Co., Ltd.)

ま え が き

従来まで広く研究され、かつ近年高度に結晶化された植物性糖化酵素“ β -アミラーゼ”は全くマルターゼ力を有しないことが認められている^(1,2,3,30)。これに反して、糸状菌においては、北原・久留島等⁽⁴⁾によつて黒麹の 1 種から採取された“ γ -アミラーゼ”を除き、*Rhizopus delemar* よりの Gluc amylase⁽⁵⁾⁽⁶⁾、*Asp. niger* よりの Amyloglucosidase⁽⁷⁾、あるいは、*Asp. oryzae* よりの糖化酵素区分^(8,9,10)等、多くの糸状菌の糖化酵素標品中にはアミラーゼ作用とともに、マルターゼ作用が伴うことが示されている。他方、糸状菌からアミラーゼ力をほとんど示さず、マルトースを分解し⁽¹⁴⁾、あるいはこれに伴つて、イソマルターゼ力及びトランスグルコシダーゼ力を有する粗標品が採取されている^(11,12,13)。

筆者が前報⁽¹⁵⁾まで精製研究をつづけてきた麹菌糖化酵素標品に於ても明かにマルターゼ作用が存在し、澱粉およびマルトースの同一基質濃度 (1~2%) に於て両者の分解率を比較した場合、アミラーゼ力とマルターゼ力の比、A/M は約 4/1[†]を示す。この比率が簡単な酸、熱処理によつては変らず、また両作用の pH-活性度曲線に明瞭な差がない等の知見はすでに認めたところであるが、本報においては更に、本標品に関していくつかの実験を行い、それらの知見のすべてを考合することによつて、ようやく本標品が単一の酵素標品であり、したがつて麹菌糖化酵素なるものはアミラーゼ力とマルターゼ力とを約 4 : 1 の比に有する酵素であることをほぼ確認した。

ただし本酵素の原料としてのタカジアスターゼ原液の示すマルターゼ力のすべてが本酵素のマルターゼ力のみ

* 本報の要旨は昭和 29 年 10 月 23 日の農化東京支部例会にて口演した。

† 前報中の誤記を訂正する。すなわち 農化 29, 182 の下から 4~3 行目にかけて“1 時間で 13.2 % の”云々とあるのは、“30 分で”のまちがいである。

に由来すると考えることは早急であり、原液中には更に別種のマルターゼ — おそらくは文献 (11)~(14) の如き — も存在することが予想される。この点は次報に記述するが、特に念のためここに附記しておく。

実 験 の 部

前報⁽¹⁵⁾においてえられた麹菌糖化酵素標品 [G] を蒸留水にて適宜稀釈して用いた。以下本報においては、記述の便宜上、その稀釈濃度の如何に拘らず、すべて単に酵素液 (enzyme solution) と略記する。

実験 I : アセトン分割沈殿物相互のアミラーゼとマルターゼ力の比, A/M の比較

酵素液に約 M/500 になるように酢酸カルシウムを添加し、氷冷しつつアセトンを注加して 0~40, 40~48, 48~51, および 51~65 vol. % の各 fractions を順次遠心分離して取り、それぞれ蒸留水にて原容になるように

Table 1. Amylase and Maltase Activities of Acetone Fractionates of the Purified Saccharogenic Amylase Preparation of *Aspergillus oryzae*. *

Fraction, vol % Activities, %	0~40		40~48		48~51		51~65		Control	
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
Reaction time, min.										
15	0.0	0.0							13.8	
30			6.2		9.8		8.1		27.5	6.8
60			12.5		19.0		15.9		13.4	
120	2.0		25.0	6.5	35.0	9.3	30.8	8.3	25.8	
240		0.0		13.5		19.0		16.0		
A/M	—		4.0/1		4.2/1		3.9/1		4.2/1	

Original enzyme soln. was precipitated by acetone at each vol. % in presence of calcium acetate at 0°, and fractionated ppts. were dissolved into equal amount of the original soln.

A: Amylase activities, indicated as % of theoretical glucose: 2% soluble potato starch 20 ml, McILVAINE buffer (pH 4.8) 4 ml, fractionated enzyme soln. 2 ml, 30°, reducing powers of 2 ml of portions of reaction mixtures were determined at time intervals by means of FEHLING-LEHMANN-SCHOORL method.

M: Maltase activities indicated as % of theoretical glucose: 2% maltose soln. were used in stead of soluble starch in the case of A.

* Referred to later report Takaamylase B (Part 11).

Table 2. Amylase and Maltase Activities of the Purified Preparation of *Aspergillus oryzae* Saccharogenic Amylase after the Treatment by Some Agents.

Agents	Concentration	Temp.	pH	min.	Residual Activities	
					Amylase	Maltase
Control	—	—	—	—	100	100
Urea	M/4	30	4.8	90	100	100
(NH ₄) ₂ SCN	M/4	"	"	"	100	100
Formalin	3%	"	"	"	100	100
K ₄ Fe(CN) ₆	M/500	"	"	30	100	100
"	M/25	"	"	"	100	100
I ₂	M/500	"	6.2	90	0	0
"	M/2000	"	"	30	25	28

つ並列にして行なつた。極面よりの高さは約 16 cm である。

酵素液 乾物として約 2% を含む液を 0.05 ml ずつ中央に帯状につけた。

緩衝液: pH 2.70 (M/20 CH₃COOH-CH₃COONa), および pH 8.10 (M/20 citric acid-M/10 NaHPO₄)

展開: 350 mV, 室温, 4 時間, pH 2.70 の場合, 0.20 mA/cm, pH 8.10 の場合 0.25 mA/cm.

発色: Ninhydrin, amido-SCHWARZ⁽¹⁸⁾, および bromphenol blue⁽¹⁷⁾ の 3 者いずれも検出可能であるが、写真効果を顧慮して bromphenol blue を用いた。すなわち、展開終了後、5 枚のうち 1 枚を 100° に 10 分間加熱したのち、B.P.B. 溶液 (昇汞を飽和した 95 vol. % EtOH に 0.1% の割合に B.P.B. をとかしたものに 10 分間浸漬し固定させたのち、流水にて洗滌し残留する青藍色の band を撮影した (Photo. 1)。

A/M の測定 展開した 5 枚のうちの残りの 3 枚をそのまま B.P.B. の発色検出帯に相当する部分の中央から ±2.5 mm の長さで切りとる (pH 2.70 の場合は -42 mm ± 2.5 mm*, pH 8.10 の場合は、+10 mm ± 2.5 mm*)。切りとつた部分を 3 枚一緒にして pH 4.8 の McILVAINE buffer 3.75 ml にて 30 分間抽出した液に

* これらの場合の electroosmotic movement は特に測定していない。

溶解し、それらについてアミラーゼ力とマルターゼ力を比較した (Table 1)。すなわち、いずれの fraction においても A/M は約 4/1 を示している。

実験 II 2, 3 の蛋白変性剤による A/M の変化の有無

酵素液に対し、数種の蛋白変性剤⁽¹⁶⁾によるアミラーゼ、マルターゼの失活度を観察したが、沃度以外は両作用とも本実験条件の範囲ではいずれも失活がみとめられず、かつ沃度の場合の失活度は両作用とも等しく、A/M に変化をみとめなかつた (Table 2)。

実験 III: Paper electrophoresis による知見 装置:

東洋濾紙株式会社製濾紙電気泳動用電流発生装置第 2 号, 展開部の構造は E. L. DURRUM⁽¹⁷⁾ の報告に準ずる。両極の緩衝液量は 75 ml ずつにした。

濾紙: 東洋濾紙 No. 50, 2 × 40 cm, 1 回の展開に 5 枚ず

ついて A/M を測定した。抽出液は展開原液に比べて約 25 倍に希釈されていることになるから、対照として展開原液を 25 倍にうすめたものを用いた。これらの液 1 ml を 2% soluble potato starch または、2% maltose 10 ml および pH 4.8 の MCILVAINE buffer 2 ml.

Table 3. Amylase and Maltase Activities determined on Aqueous Extracts of Strips of the Paper*. (→Photo 1)

pH of Development Strips	2.70		8.10		Control	
	-42± 2.5mm		+10± 2.5mm		—	
Enzymation, min.	Activities		Activities		Activities	
	A	M	A	M	A	M
15	13.7	—	10.7	—	18.9	—
30	26.4	6.8	19.8	5.3	35.9	8.9
60	—	13.3	38.8	11.2	46.8	16.8
A/M	4.0/1		4.0/1		4.2/1	

* See text.

究室 池中徳治氏談), 上記の結果から直ちに本酵素標品の単一性を云々することは危険であるがともかくも 1 つの根拠になるものといえるであろう。

[附] 本標品について、東大医学部生化学教室平井秀松先生に依頼し、TIESELIUS の電気泳動図をとっていただいた。Sample が少量であつたためと写真撮影の都合で誌上に掲載しうるようなものがとれなかつたが一応参考として Photo. 2 に掲げておく。同氏によれば、少くとも TIESELIUS の判定限界に関する限り、単一成分と断定しうるといふ。

実験 IV : アミラーゼ作用に対するマルトースの拮抗阻害

本酵素標品のアミラーゼ作用は、各種濃度の

Table 4a. Inhibition of Maltose upon the Starch Hydrolysis by Purified Preparation of *Aspergillus oryzae* Saccharogenic Amylase.

Soluble potato starch %	2.0	2.0	2.0	2.0
Maltose, %	0	0.5	1.0	2.0
Enzymation, min.	Amylase activities, N/20 Na ₂ S ₂ O ₈ ml.*			
	15	30	60	
15	1.70	1.30	1.00	0.76
30	3.10	2.58	1.95	1.50
60	7.20	5.20	4.00	3.10
Rates of Act. %	100	76	58.4	44.4

* Total 26 ml of the substrates solns. containing 2 ml of enzyme solns., 30°, pH 4.8, reducing powers were determined on 2 ml portions of reaction mixtures by means of FEHLING-LEHMANN-SCHOORL method and indicated as ml of N/20 Na₂S₂O₈.

マルトースの存在によつて順次明かな阻害を受ける。(Table 4a). しかしてその阻害は拮抗的である (Table 4b および Fig. 1). ただし、この実験における活性度の比較は、単に還元力の増加量をもつてしたために、添加したマルトース自身が分解されて増加する還元力も当然、その中に含まれてくる筈であるが、その補正は實際上不可能であるから、後者の量になるべく少くするように酵素液の温度および作用時間を考慮して行なつたのである。

さて、この拮抗阻害現象に対しては種々の考察が与えられるであろうが、本酵素標品が、アミラーゼ作用とマルターゼ作用をともしに行いうる単一活性基をもつた単一酵素であり、澱粉ならびにマルトースを拮抗的に結合、分解すると考えればもつとも無理なく説明することができる。更にこの場合、マルトースに対する MICHAELIS constant を一方でマルターゼ力から算出し、他方で拮抗阻害のデーターから算出し、両値が一致することを知りうれば、さらに確実な根拠としうるわけであるが、前記の如き理由によつて、その実験値の補正の困難から

混液に添加し、30°で作用させ、FEHLING-LEHMANN-SCHOORL 法による還元力の増加をグルコシッド結合分解率で示した (Table 3).

かくして Photo. 1 にみるごとく、本実験条件において本酵素標品はかなりはつきりした 1 本の polypeptide 性 band を示し、かつ Table 3 にみるごとく、その部分の A/M が対照原液とかわりない。1 般に paper electrophoresis において、2 種以上の異なる物質を同時に 1 枚の濾紙上に展開する場合、本来ならば相互に別個の位置に検出される筈のものが、同一の位置に重なる場合もあるとのことなので (阪大赤堀研

Fig. 1. Competitive Inhibition of Maltose upon the Starch Hydrolysis by Purified Preparation of *Aspergillus oryzae* Saccharogenic Amylase. (→ Table 4b)

Photo. 1 Paper electrophoresis of the Purified Preparation of *Aspergillus oryzae* Saccharogenic Amylase.

- (1) pH 2.70 ($\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$ M/20)
 (2) pH 8.10 (M/20 Citric acid-M/10 Na_2HPO_4)
 Both detected by Bromphenol blue.

Photo. 2. TIESELIUS Electrophoresis of the Purified Preparation of *Aspergillus oryzae* Saccharogenic Amylase.

pH 8.0 phosphate buffer. 20°, 60 min.

むしろ意識的にそのところみを行わなかつた。なお、Table 4 b に併記した如く、グルコースはアミラーゼ作用、マルターゼ作用ともに阻害を示さない。また、あらかじめマルトースのみに本酵素を作用させ、それが分解されたのちに、澱粉を加えた場合にも、全く阻害がみとめられない。

考 察

一般にある酵素標品の単一性を云々するには、それ

Table 4b. Effect of Maltose and Glucose upon the Starch and Maltose Hydrolysis by Purified Preparation of *Aspergillus oryzae* Saccharogenic Amylase.

Soluble potato starch. %	2		1.5		1.0		0.5		1.0		0.0	
Maltose. %	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0	0	1.0
Glucose. %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	0	1.0
Activities*												
Enzymation. min.	<i>v</i>	<i>v_i</i>	<i>v</i>	<i>v_i</i>	<i>v</i>	<i>v_i</i>	<i>v</i>	<i>v_i</i>	<i>v</i>	<i>v_i</i>	<i>v</i>	<i>v_i</i>
15	1.70	1.00	1.70	0.86	1.70*	0.68	1.56	0.50	1.70	1.72	—	—
30	3.60	2.00	3.60	1.70	3.55	1.38	2.66	1.00	3.58	3.60	0.40	0.42
60	7.20	4.05	7.00	3.70	6.00	2.90	3.36	2.10	5.96	5.94	0.80	0.80
Rates of Inhibition.												
$(1 - \frac{v_i}{v}) \times 100$	41		49.5		60		68		0		0	

* : Total 26 ml of substrates solns. containing 2 ml of enzyme soln., 30°, pH 4.8, reducing powers of 2 ml of the reaction mixtures were determined by means of FEHLING-LEHMANN-SCHOORL method and indicated as ml of N/20 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. *v*: absence of inhibitor, *v_i*: presence of inhibitor.

が結晶化するものは先ず結晶化し、再結晶における性質の推移、電気泳動諸条件下の観察、超遠心分離、溶解度その他、なしうる限りの実験結果の集積をまつて検討されねばならぬとされている。本酵素標品は未だ結晶化をみず、かつ上記の諸知見をすべて実施しえない研究段階であるから、もとより筆者は本酵素標品の物質としての単一性をここで早急に断定するつもりはない。しかしながら、すくなくもそのアミラーゼ作用とマルターゼ作用に関する限り、これまでに記述した酵素的知見のすべてを考合すれば、おそらくは単一酵素に由来するものであると考えてよからうと思われる。もしたとえ2種又はそれ以上の酵素の共存によるものとしても、それらはきわめて密接な物理化学的類似性を有し、常に同一行動をとりつつ作用をあらわし、実際にはあたかも単一酵素として取扱いうるものとして差支えないであらう。

かくして、今後、何等かの方法によつて、本酵素標品の有する両作用が、明かに別途の酵素によるものである

という知見がえられない限り、筆者はここに両作用を併用した単一酵素の存在を想定しておきたい。しかし、本酵素と他の類似酵素との異同、ならびに本酵素の呼称については次報の考察の部に記載する。また文献、総括等も次報にとりまとめて記載する。

各種糸状菌のアミラーゼに関する研究 (第 11 報)

麹菌糖化酵素のアミラーゼ作用とマルターゼ

作用について (その 2)*

岡 崎 浩 (三共株式会社高峯研究所)

昭和 29 年 11 月 8 日 受理

Studies on Amylases of Various Species of Molds. Part 11. Amylase and

Maltase Actions of Saccharogenic Amylase of *Aspergillus oryzae* (2)

By Hiroshi OKAZAKI (TAKAMINE Research Laboratory, SANKYO Co., LTD.)

ま え が き

第 7～8 報⁽¹⁰⁾ 及び第 9 報⁽¹⁵⁾ に亘つて記述した操作によつてタカチアスターゼから得られた麹菌糖化標品は第 10 報の所論によつて、ほぼ純粋なものであり、麹菌糖化酵素なるものはアミラーゼ力とマルターゼ力とを約 4:1 の比に有するものであることが確認された。

本報においては、更に実験 V～VII を行い、この結果から、(1) 麹菌糖化酵素は澱粉分子の末端から直接グルコース単位に切断する作用を有すること、及び (2) 本酵素のマルターゼ作用は、トランスグルコシダーゼ作用や、イソマルターゼ作用を伴わない性質のものであることを知つた。かくして本酵素に対し改めて Takaamylase B と命名することを提唱し、これとすでに発表されている他の類似酵素との異同について考察し、あわせてその他の諸問題に関する総合的考察を与えた。

実験 V: C¹⁴-澱粉を用いる澱粉分解機構の 1 知見

本酵素の澱粉分解生成物は、bakers' yeast を用いる SOMOGYI の選択酸酵法⁽²³⁾⁽⁴¹⁾、ならびに Photo. 3 に

Photo. 3. Hydrolysis of Maltose and Soluble Potato Starch by Purified Preparation of *Aspergillus oryzae* Sacchrogenic Amylase and Paper Chromatographs of the Starch Hydrolyzates.

A : Total 26 ml of buffered 1% maltose soln. containing 4 ml of enzyme soln., pH 4.8, 30°.
B : Total 26 ml of buffered 1% soluble potato starch soln. containing 2 ml of enz. soln., pH 4.8, 30°.

Paper chromatographs : 0.05 ml of 10 times concentrated solns. of B-hydrolyzates were developed 3 times by multiple development technique (28).

Pyridine: butanol: water = 2:3:1.5, anilin-hydrogenphthalate 120°, 20~25 min.

* 本報の要旨は昭和29年10月23日の農化関東支部例会にて口演した。