Neurospora 属の水解酵素の利用について (第 1 報)*

岡本 勇, 薄衣俊郎, 星 晴夫 (山形大学農学部)

昭和 31 年 5 月 14 日 受 理

I. 緒 言

我々は東北高冷地開拓地の生産するとうもろこしの加工利用として *Neurospora* 属かびを応用した醗酵製品を研究している. その目標は酵素, 食料, 調味料並に飼料の製造である. 製品の研究に先だつて一応国内で入手した 22 種の *Neurospora* 属の菌株について水解酵素中, 特にプロテイナーゼ, アミラーゼ, pectin-depolymerase の活性度を比較測定し, その利用性の目安を得たので報告する.

II. 実 験 の 部

研究の対象とした菌株 22 種は第 1 表に示してある.

I) Pectin-depolymerase の活性度について

第 1 表 使 用 菌 株				第 2 表 Minimal Medium-1 の組成	
番号	菌 株	備 考			
1	<i>Neurospora crassa</i> 2035	長尾研究所より分譲		酒石酸アンモン	5 g
2	" " 2047	"		硝酸アンモン	1 g
3	" " 2048	"		重燐酸カリ	1 g
4	" " 2075	"		硫酸マグネシウム	0.5 g
5	" " 2075'	"		塩化カルシウム	0.5 g
6	" " 2076	"		塩化ナトリウム	0.1 g
7	" " 2077	"		ペクチン	5 g
8	" " 2078	"		グルコース	10 g
9	<i>Neurospora sitophila</i> 岡崎	"		ビオチン	5 μ g
10	" " 大連	"		微量塩類溶液	1 cc
11	" " 江本 2021	"		再溜水で 1 l とする.	
12	" " 蘇鉄 2024	"			
13	" " 武豊 2025	"			
14	" " 天狗 2026	"		微量塩類溶液	
15	" " 新高	"		硼 砂	88 mg
16	<i>Neurospora tetrasperma</i> 2024	"		モリブデン酸アンモン	64 mg
17	<i>Neurospora sitophila</i> sp, 2031	"		塩化第 2 鉄	500 mg
18	" " F-21 東京大学応用微研より分譲			硫酸亜鉛	2 g
19	<i>Neurospora crassa</i> F-25	"		塩化第 2 銅	270 mg
20	<i>Neurospora sitophila</i> F-26	"		塩化第 1 マンガン	45 mg
21	" " W-1 東北大学植村研究室より分譲			再溜水で 1 l とする.	
22	" " 56 東京農業大学住江研究室より分譲				

E. ROBOZ 等⁽¹⁾は SY 7 A なる野生種を分離してその活性度の強力なる事を証明している. その他本酵素の性質を研究してトマトの pectin-depolymerase とは別種なる事も証明している. なお本研究においては ROBOZ 等が使用した minimal 培地⁽²⁻⁴⁾ (以下 M.M 培地と略称す. この M.M 培地は第 2 表 minimal medium-1 のペクチン 5 g, グルコース 10 g がシュクロース 15 g となつている培地である) 及び分析法を参考とした. 亦対照として *Asp. niger* No. 55 Tohokū について行つた.

A. 酵素液の調製法

培養法 人工培地 (minimal medium-1, 第 2 表参照) による液内振盪培養法を使用した. 即ち乾熱殺菌した 500 cc 容の坂口フラスコに M.M-1 培地を 100 cc 分注し, 常法により殺菌を行い, 麴寒天斜面培養した材料より 1 cc 当り 4×10^6 の孢子懸濁液を造り, その 2 cc を接種し, 振幅 8 cm, 廻転数 120 r.p.m. の往復振盪器に室温 28~30° で 10 日間培養した. その濾液を酵素液とした. なお測定の便宜上酵素濃度を高める為に 25° 以下にて減圧濃縮し 1/4 にしたものを D₁ とし, 作用強力なものは濾液そのままを用いた. これを D₀ とした (第 4 表備考参照). 対照区については藤井等⁽⁵⁾の培地を用い孢子濃度は同一にした. 同様に振盪培養して 10

* On the Utilization of Hydrolase of *Neurospora* sp. Part I.

By Isamu OKAMOTO, Toshiro USUGINU and Haruo HOSHI (Faculty of Agriculture, Yamagata University)

日目の濾液について D_0 の如く処理し酵素液とした。

B. 活性度の表示

基質：ペクチン⁽⁶⁾ (N.B.C. 製, 水分 9.25%, 灰分 0.74%, Ca-pectate 102.0) 1 g を約 40 cc の水に溶かし MC ILVAINE 緩衝液 (pH 6.0) を 50 cc 加え NaCl を 0.1 M なる如く添加し全量を 100 cc とする。

反応液及び分解⁽⁷⁾：上記基質 16 cc を大型試験管にとり 30° 恒温槽にて恒温となし約 20 分後等温の酵素液 4 cc を加え攪拌し経時的に 0 時間, 2 時間, 4 時間の酵素作用を 0.1 N NaOH 8.0 cc で停止せしめ, この液 10 cc をオストワルド粘度計にて 30° で落下時間を測定し WEBER-DEUEL Abbauzahl で表わした。即ち

$$A = \frac{V_0 - V_n}{V_0 - V_s} \times 100$$

V_0 ……0 時間における落下時間
 V_n ……経時供試料の落下時間
 V_s ……その粘度計における純水の落下時間

対照の *Asp. niger* は基質に NaCl を含まず pH 4.0 とした。

II) アミラーゼの活性度

A. 酵素液の調製法

培養法：液内振盪培養法と固体麹培養法を行った。

第 3 表 Minimal Medium-2

の組成	
酒石酸アンモン	5 g
硝酸アンモン	1 g
重磷酸カリ	1 g
硫酸マグネシウム	0.5 g
塩化カルシウム	0.1 g
塩化ナトリウム	0.1 g
シクロロース	7.5 g
グルコース	7.5 g
ビオチン	5 μ g
微量塩類溶液	1 cc
再溜水で 1 l とする。	
微量塩類溶液	
硼 砂	88 mg
モリブデン酸アンモン	64 mg
塩化第 2 鉄	500 mg
硫酸亜鉛	2 g
塩化第 2 銅	270 mg
塩化第 1 マンガン	45 mg
再溜水で 1 l とする。	

第 4 表 WEBER-DEUEL-Abbauzahl

菌株番号	2 時 間 (反応時間)	4 時 間 (反応時間)	備考
1	2.5	4.5	D_1 *
2	4.9	6.9	"
3	5.7	6.3	"
4	9.8	14.4	"
5	14.8	18.2	"
6	13.2	16.1	"
7	11.4	17.9	"
8	8.3	11.9	"
9	1.7	1.7	"
10	9.9	13.9	"
11	82.5	88.2	D_0
12	12.9	18.1	D_1
13	6.4	14.6	"
14	4.1	6.7	"
15	1.9	3.0	"
16	13.3	17.6	"
17	1.9	4.7	"
18	85.2	95.1	D_0
19	8.8	11.1	D_1
20	0.1	0.2	"
21	0.1	2.7	"
22	0	1.1	"
<i>Asp. niger</i> 50.7		66.0	D_0

註 数字はいずれも培養液そのまゝの活性度に換算してある。

* 実験に用いた酵素液の濃縮度を示す。

第 5 表 M. M-1 培地におけ

菌株番号	菌体乾物重量 (g)	抽出濾液 (cc)
1	0.6	180
2	0.7	180
3	0.4	184
4	1.0	180
5	0.6	177
6	0.7	180
7	0.8	170
8	0.5	180
9	0.5	180
10	0.6	182
11	0.8	180
12	0.9	170
13	0.6	181
14	0.4	187
15	0.6	184
16	0.4	182
17	0.4	190
18	0.4	185
19	0.5	180
20	0.9	177
21	0.6	180
22	0.5	168
<i>Asp. niger</i>	2.4	120

1) 液内振盪培養法：ROBOTZ 等の M. M 培地のシクロロースの半量をグルコースで置き換えた培地を用い (第 3 表参照, 以下 M. M-2 で表わす), 他の条件は pectin-depolymerase と同一とした。濾液は 25° 以下で 1/4 に減圧濃縮し酵素液とした。

対照区も前記同様に行いその濾液を 1/4 に濃縮し酵素液とした。

2) 固体麹培養法：乾熱殺菌した綿絨 200 cc 容三角フラスコに小麦麹 10 g と井戸水 70 cc を加え殺菌し, 1 白金耳づつ胞子を移植し, 30° で 7 日間培養し後 3 日間乾燥器にて乾燥粉碎し, 内 5 g を秤量し, これに蒸溜水 100 cc とトルエン 1 cc を添加, 室温にて 12 時間抽出しその濾液を酵素液とした。

B) 活性度の表示

澱粉糖化力測定法：可溶性澱粉 (関東化学製) 2% 溶液 100 cc, MC ILVAINE の緩衝液 (pH 4.8) 10 cc, トルエン 1 cc を 30° 恒温槽に約 15 分間保つ。これに酵素液 10 cc を添加し, 3 時間, 7 時間, 10 時間毎に作用混液よりそれぞれ一定量を採り FEHLING-LEHMANN-SCHOOL 法により直接還元糖をグルコースとして定量し, 見掛けの糖化率を測定した。

第 6 表 アミラーゼの活性度

菌株番号	反応時間	M. M-2 培地 (振盪法)			麩 麴 法		
		3 時間	7 時間	10 時間	3 時間	7 時間	10 時間
1		4.07	10.28	14.50	61.53	70.61R	70.61R*
2		5.73	13.48	19.99	31.20	48.66	51.71R
3		4.33	14.41	17.16	48.20	52.32	58.65
4		3.82	10.87	15.53	24.01	42.71	51.79
5		0	3.36	10.10	41.84	54.32R	56.17Y
6		5.04	25.21	38.76	42.72	53.73	57.55
7		0	0.50	0.67	40.21	43.26	49.99
8		1.91	2.42	6.01	37.38	40.18	45.80
9		4.62	8.43	26.98	6.12	21.37	21.34
10		1.09	3.19	5.11	64.09	65.34	69.75
11		2.53	2.20	8.04	49.33	60.01R	65.39R
12		0.75	4.94	5.89	41.14	53.16	54.31
13		7.81	15.80	23.55	23.38	46.10	51.82
14		2.72	11.43	18.44	21.98	44.59	50.83
15		3.88	9.21	12.96	60.78R	66.27Y	66.70Y
16		4.04	10.14	14.31	41.21	59.73	62.40
17		7.44	18.23	25.42	63.64	63.64	65.21
18		3.06	8.51	12.05	44.38	54.70	55.40
19		3.91	11.0	15.52	39.60	57.94	60.16
20		2.93	7.30	11.55	50.35	58.44	59.25R
21		3.27	8.92	12.77	59.53	61.80Y	68.08Y
22		1.08	1.41	1.58	49.76	50.35R	52.02Y
Asp. niger		0.28	5.87	7.67	23.34	38.27	46.55

註 液体培養法の数字は培養液を 1/4 に濃縮したものについて実験した数値そのままである。

* ヨウ素澱粉反応 R…赤, Y…黄, 無…紫

第 8 表 プロテイナーゼの活性度

菌株番号	反応時間	M. M-2 培地 (振盪法)			麩 麴 法		
		3 時間	7 時間	10 時間	3 時間	7 時間	10 時間
1		1.29	2.34	2.54	1.14	3.86	3.90
2		4.67	6.04	6.85	3.71	8.12	12.98
3		1.00	3.39	3.64	1.76	4.62	6.35
4		3.84	9.47	13.67	3.84	9.47	13.67
5		1.18	1.18	1.19	0.53	4.10	7.22
6		0.70	0.70	0.71	1.22	5.11	5.79
7		1.27	1.27	1.29	4.20	12.97	16.13
8		0.88	0.88	0.98	7.05	16.50	25.88
9		0.92	2.91	2.93	3.51	8.06	11.26
10		0.00	1.97	3.44	4.06	5.79	7.93
11		0.35	1.37	1.63	9.49	23.57	31.83
12		0.00	0.60	1.82	1.22	4.55	6.92
13		1.35	5.09	5.83	16.37	40.58	50.32
14		3.92	6.60	9.88	16.06	34.19	46.04
15		0.62	3.06	3.50	8.86	22.99	30.81
16		0.00	0.44	0.57	2.09	5.66	8.17
17		0.30	0.39	0.53	3.09	4.34	7.65
18		1.02	3.69	4.30	3.53	7.06	7.16
19		0.23	0.36	0.38	1.19	4.42	5.37
20		0.71	0.73	0.88	1.84	3.28	4.65
21		0.19	0.38	0.45	2.41	3.94	5.99
22		0.11	0.36	0.46	2.28	4.46	7.39
Asp. niger		0	0.41	0.42	3.00	3.99	4.89

註 液体振盪培養法の数字は培養液を 1/4 に濃縮したものについて実験した数値そのままである。

第 7 表 M. M-2 培地による振盪培養の菌体重量

菌株番号	菌体乾物重量 (g)	抽出液 (cc)
1	0.6	180
2	0.6	180
3	0.5	180
4	0.6	180
5	0.6	180
6	0.5	185
7	0.8	175
8	0.6	180
9	0.5	185
10	0.7	175
11	0.7	175
12	0.7	170
13	0.7	175
14	0.4	180
15	0.5	180
16	0.5	180
17	0.5	180
18	0.6	180
19	0.6	175
20	0.8	170
21	0.7	175
22	0.7	175
Asp. niger	2.2	150

澱粉液化力測定法 : 澱粉糖化力測定の場合と平行して 0.5 cc を採り出し蒸溜水 2 cc を添加し N/100 ヨウ素・ヨウ素カリ溶液 2 滴を滴下してヨウ素澱粉反応を見た。なおこの際デキストリン溶液を対照として用いた。

III) プロテイナーゼの活性度

A. 酵素液の調製法

アミラーゼの場合と同様に行つた。

B. 活性度の表示

蛋白分解力測定法 : トリクロール酢酸法を用いた。即ち乳製カゼイン 3% 溶液 75 cc に磷酸緩衝液 50 cc を混じ、トルエン 1 cc を添加して予め 38° に保つ、これに酵素液 10 cc を添加し 3 時間, 7 時間, 10 時間毎に 10 cc を採り, 10% トリクロール酢酸 5cc 中に投入, 約 20 分間放置後濾過し, 濾液についてマイクロケルダール法にて総窒素を定量し, 使用したカゼインの水解度を測定した。

III. 実験結果並びに考察

[A] Pectin-depolymerase の活性度は第 4 表に示す。同時に測定せる菌体重量は第 5 表に示す。菌株によつて差は甚だしい。優秀なものとしては No. 11, No. 18 の 2 株である。次に No. 5, 7, 12, 16 であつた。然し前者に比し甚しく劣る。菌体重量は対照に比し 1/3 程度であつて著しく少くない。乾物は芳香を有し, 利用性が考えられる。

[B] アミラーゼの活性度

麩麴法による力価は第 6 表を参照されたい。又その内液体振盪法の菌体乾物量は第 7 表を参照されたい。一般

的に麹菌等に比しやや劣る。しかし No. 1, 10, 11, 15, 17, 21 等において若干有力である。液体培地(M. M-2)による力価を見ると No. 6, 9, 13, 17 等が有力であり、培養法により力価は併行しない如く伺われる。また味噌用に供せられているものに比較的強力なる菌株を発見する。

〔C〕 プロテイナーゼの活性度

液体振盪法並びに皺麹法の成績は一括して第 8 表を参照されたい。皺麹法の数字を以つて見るに、醤油、味噌用麹菌等に比して相当劣る事が分る。有力な菌株と雖も 2/3 位の力価である。No. 13, 14 は比較的良く、ついで No. 11, 15, 8 の順位である。液体振盪法では No. 4, 14, 13 等が良く、ついで No. 3, 10, 9, 15, 18 等を挙げることが出来る。味噌用の菌株は一般に良いようである。

IV. 要 約

とうもろこしの醗酵製品製造の手段として *Neurospora* 属中国内で入手した 22 種菌株について、予めその酵素の力価を測定して利用性についての予備的検索を行った。

その結果 pectin-depolymerase については有力なもの 2 株を見付けたが、アミラーゼ、プロテイナーゼについては一般麹菌に劣るが、本属としては菌株間に相当の差あり、比較的有力なものを見付けた。

なおとうもろこしを資材とした時、その他窒素源、炭素源による酵素生産性については第 2 報以下で報告する予定である。

昭和 30 年 8 月 5 日の日本農芸化学会東北支部大会にて講演した

(1) E. ROBOTZ : <i>J. Biol. Chem.</i> , 195, 459 (1952).	(5) 藤井等 : 醸工誌, 30, 434 ; 30, 467 (1952).
(2) G. W. BEADLE, E. L. TATUM <i>Amer. J. Bot.</i> , 32, 678 (1949).	(6) Z. I. KERTESZ : The Pectic substances (1951).
(3) E. ROBOTZ : <i>Abst. Amer. Chem. Soc. Det.</i> , (1949).	(7) 斎藤, 蓑田, 丸茂 : 本誌, 28, 810, 814 (1954).
(4) H. LINEWEAVER, E. F. JANSEN : <i>Adv.</i>	

澱粉の分離 精製に関する研究 (第 1 報)*

各種澱粉の品質とその無機成分との関係について (その 1)

鈴木繁男, 久保彰治, 広幡哲夫, 根本芳郎, 荒井克祐 (農林省食糧研究所)

昭和 31 年 5 月 17 日 受理

ま え が き

従来は各種澱粉の無機物については、澱粉の純度を判定する一指標として粗灰分 (crude ash) として表示されることが多かったが、その灰分中の各元素の構成についてはあまり検討されていない。これまで特定の澱粉について、それぞれの目的に応じて無機成分の分析を行ったものも若干あるが⁽¹⁾、同時に多数の澱粉の主要無機成分について比較検討した報告には接していないので、われわれは次の 4 観点からわが国に主に生産され、実際面に多く用いられている各種澱粉について無機成分の構成について研究した。

最近、各種澱粉糊の流動学的性質と澱粉中の無機成分とが重要な関連をもつことが認められて来ている。例えば普通の馬鈴薯澱粉はカリウム澱粉の形であるが、これをイオン交換してカルシウム澱粉にすると糊の粘度が著しく減少する事実が報告されている⁽²⁾。これまで繊維の糊料には、その目的に応じて各種澱粉中より経験的にそれぞれ適当なものが選ばれていたが、その糊料としての性質の差はそれぞれの澱粉のアミロース、アミロペクチンの組成その他澱粉の分子構造の差等に基づくことは当然であるが、更にその無機成分が糊の強さ、こし、粘性、弾性等にかなりの影響を及ぼすことが考えられる。

更に澱粉を水飴・葡萄糖の原料として用いる際に、原料澱粉中の無機物が糖化に使用する酸の効力を低下した

* Studies on the Separation and Purification of Starches. Part I. Relation between the Quality of Various Starches and Their Inorganic Constituents (1)
By Shigeo SUZUKI, Shoji KUBO, Tetsuo HIROHATA, Yoshiro NEMOTO and Katsusuke ARAI
(Food Research Institute, Ministry of Agriculture & Forestry)