総 括

(1) *A. agile* ATCC 9046 を用いロイシンのようなアミノ酸に対する酸化能は適応的に発現し得ないが、炭素源によっては生育を著しく阻害するアミノ酸のあることを明らかにした。

(2) この菌の磨砕標品は多くのアミノ酸を酸化し得ないが、TCA 系から直接誘導されるアミノ酸ではやや酸化が認められる。併しグルタミン酸は例外的に強い酸化をうける。このことからグルタミン酸々化機作検討の重要性について論じた。

御懇篤な指導を頂いた植村教授に厚く謝意を表します。又御批判と激励を与えられた古坂教授、尾田助教授、御協力を頂いた研究室の諸兄姉に感謝します。

(1) 須藤恒二：本誌，31，239 (1957).	(5) 宇佐美正一郎，他：生物科学，進化特集 49 (1954).
(2) 前田喜美子，宇佐美正一郎：酵素化学シンポジウム，10，228 (1954).	(6) W. E. Magee, R. H. Burris: <i>J. Bacteriol.</i> , 71, 635 (1956).
(3) E. R. Roberts, et al.: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 14, 85 (1954); 14, 507 (1954); 15, 568 (1954); 21, 308 (1956); 21, 562 (1956).	(7) J. E. Greaves, et al.: <i>Soil Sci.</i> , 49, 9 (1940).
(4) M. F. Utter, C. H. Werkman: <i>Biochem. J.</i> , 36, 485 (1932).	(8) M. Alexander, P. W. Wilson: <i>J. Bacteriol.</i> , 71, 252 (1956).

黒麹菌の Amylolytic System に関する研究 (第 3 報)*

各種生澱粉の糖化とアミラーゼ吸着との関係について

上 田 誠 之 助 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 5 月 24 日 受理

緒 言

著者等はさきに黒麹アミラーゼが黄麹，麦芽アミラーゼに比し生澱粉を著しく容易に分解しうる事を報じ⁽¹⁾，更にアミラーゼ系を糖化型及び液化型区分に分取し，その糊化澱粉及び生澱粉の糖化機構を調べた^(2,3)。本報では黒麹アミラーゼ系が生澱粉を分解する事とアミラーゼの生澱粉への吸着との関連性につき報告する。

アミラーゼが生澱粉に吸着される事は古くから知られ，Holmberg は麦芽の α -及び β -アミラーゼの分別に用い⁽⁴⁾，次で Schwimmer 等は小麦澱粉への吸着の過程を通して麦芽 α -アミラーゼの結晶化に成功した⁽⁵⁾。又同氏等は各種生澱粉の麦芽 α -アミラーゼ吸着能が澱粉粒の大小に逆比例する事を報じている⁽⁶⁾。徳岡⁽⁷⁾は蒸米吸着で黄麹の α -アミラーゼを，北原，久留島⁽⁸⁾は同じく蒸米吸着で γ -アミラーゼを精製した。しかし各種生澱粉の糖化の難易とアミラーゼ吸着との関係についての報文には接しないのでここに報告する。

実 験 の 部

試料 玉蜀黍，甘藷，馬鈴薯の各澱粉は日本澱粉株式会社より恵与されたものを更に数回蒸溜水にて洗滌し，遠心分離後，通風乾燥機にて乾燥したもの。小麦澱粉はメルクの化学用製品をそのまま使用した。糯米澱粉は当教室にてアルカリ浸漬法により調製した。分析結果は左の如し。馬鈴薯澱粉；全糖分 87.35%，水分 19.55%，甘藷澱粉；全糖分 90.58%，水分 16.62%，小麦澱粉；全糖分 91.74%，水分 14.67%，玉蜀黍澱粉；全糖分 88.41%，水分 16.21%，糯米澱粉；全糖分 90.98%，水分 14.83%。

1) 各種生澱粉分解に対する酵素濃度の影響

さきの報告⁽¹⁾に於ては 1g の澱粉に対し酵素液として，10% 黒麹抽出液 20 ml を含む反応液 160 ml を加えたが，本実験に於ては麹抽出液量を 1, 2, 5, 10, 20 ml と変え，緩衝能の影響を考慮して，麹抽出液を 30 分

* Studies on the Amylolytic System of the Black-koji Molds. Part III. Relationship between the Susceptibility to Digestion and the Efficiency of Adsorption of Black-koji Amylase by Raw Starch.

By Seinosuke UEDA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

第1表 各種生澱粉分解と酵素濃度との関係

反應時間		酵素濃度 (ml)	1	2	5	10	20
玉蜀黍	16		0.024	0.035	0.080	0.146	0.262
	40		0.122	0.180	0.374	0.511	0.741
	64		0.197	0.338	0.622	0.787	0.884
	112		0.346	0.586	0.843	0.886	0.884
甘藷	16		0.030	0.042	0.107	0.148	0.169
	40		0.066	0.117	0.243	0.299	0.346
	88		0.157	0.235	0.418	0.530	0.632
	112		0.197	0.334	0.525	0.640	0.758
馬鈴薯	16		0.029	0.034	0.039	0.043	0.064
	40		0.050	0.058	0.068	0.084	0.106
	64		0.061	0.075	0.092	0.129	0.134
	112		0.066	0.096	0.118	0.138	0.176

間煮沸し、冷却後原容に帰したものを夫々 19, 18, 15, 10, 0 ml 添加し、更に前回同様緩衝液 20 ml, 水道水 120 ml, トルオール 1 ml を加え 30° にて反応せしめた。所定時間後の還元力の増加を 1 g 澱粉よりの生成葡萄糖 g 数として計算した。結果は第 1 表に示した。

今 40 時間に於ける各種生澱粉よりの生成糖と酵素濃度との関係を図示せば第 1 図の如し。

第1図より明かな様に、糖化されやすい玉蜀黍澱粉では酵素量 20 ml 迄酵素量の増加に伴つてその分解量を増すも、甘藷澱粉では酵素量 5 ml 迄は酵素量の増加に伴つて分解量を増し、それ以上の酵素量では分解量の増加が著しく少くなる。最も糖化されにくい馬鈴薯澱粉では酵素濃度の増加による分解量の増加が極めて少い事が判明した。この事より各種生澱粉間に見られる被糖化性の難易は酵素の澱粉に対する親和力の大小に比例しているのではないかと思われる。即ち最も糖化されにくい馬鈴薯澱粉では既に酵素量 1 ml で飽和され、甘藷澱粉では 5 ml にて飽和され、三者の中で最も容易に糖化される玉蜀黍澱粉では 20 ml でも未だ酵素に対する親和力は残つているものと思われる。この親和力がアミラーゼの生澱粉への吸着と関係があるものか否かを究明する。

2) 吸着アミラーゼの糖化作用

吸着操作：玉蜀黍澱粉 1 g に黒麹抽出液 10 ml, Total 0.884 g
 M/10 クエン酸ソーダー塩酸緩衝液 (pH 3.6) 5 ml を加え、室温に 30 分間時々攪拌しつつ放置した後、遠心分離にかけ、沈澱した澱粉は更に pH 3.6 の上記緩衝液の 3 倍稀釈液 15 ml で 4 回洗滌を繰返す。その澱粉*を次の第 2 表に示す組成の実験に供した。

上記組成の反応液を 30° に保ち所定時間後還元力の増加を澱粉 1 g より の葡萄糖 g 数であらわした。結果は第 3 表の如し。

第3表より明かな様に澱粉に吸着されたアミラーゼ (No. 1, 2, 3, 4) が生澱粉の糖化に関与する事を知った。

3) 澱粉粒子の大小と生澱粉の糖化の難易

第1図 各種生澱粉の分解と酵素濃度との関係

●—● 玉蜀黍澱粉 ○—○ 甘藷澱粉
 ⊙—⊙ 馬鈴薯澱粉

第2表 吸着アミラーゼによる生澱粉糖化の反応液組成

實驗系列	No.	1	2	3	4	5	6	7
吸着處理澱粉	g	1	1	1	1	0	0	0
未處理澱粉	g	0	0	0	0	1	1	1
酵素液	ml	0	1	5	10	1	5	10
熱失活酵素液	ml	10	9	5	0	9	5	0
緩衝液 (pH 3.6)	ml	10	10	10	10	10	10	10
水道水	ml	20	20	20	20	20	20	20
水全容	ml	40	40	40	40	40	40	40

各々トルオール 0.5 ml 添加

第3表 吸着アミラーゼによる生澱粉糖化

No. 時間	1	2	3	4	5	6	7
16	0.391	0.426	0.493	0.505	0.137	0.356	0.500
40	0.782	0.804	0.828	0.828	0.288	0.702	0.821
60	0.872	0.886	0.876	0.876	0.456	0.875	0.884
Total	0.884 g						

* この澱粉の附着水は予め秤量した遠心管の使用により計算し、それだけ加える水量を加減した。

さきに Schwimmer 等⁽⁶⁾は麦芽 α -アミラーゼの生澱粉への吸着の場合、澱粉の表面積の大なるもの程アミラーゼをよく吸着する事を報じている。前節に於て吸着アミラーゼが生澱粉を分解する事を知ったので、果して生澱粉の分解の難易が粒の大小に比例するや否やを検討した。

小麦澱粉は大は 25.4 μ から小は 6 μ 迄種々の粒子が混り、玉蜀黍澱粉では平均 16 μ 位に粒子が揃っている。この 2 種の澱粉につき検討した。

先ず小麦澱粉を水道水に懸濁して軽く遠心分離にかける。液部に平均 6 μ 位の小粒子が残っているので、液部と沈澱部とを別々に乾燥し、試験に供した。生澱粉分解の反応液の組成は既報⁽¹⁾の如し。但しこの場合は比較の標準を玉蜀黍澱粉におき、各小麦澱粉はその全糖分に応じ玉蜀黍澱粉 1 g に相当する量を供試した。結果は第 4 表に示した。

即ち小麦澱粉の一定資料では粒子の小さいもの程糖化容易なるも、異種澱粉間（玉蜀黍と小麦）にはこの様な関係は見られない。澱粉粒本来の構造の相違に原因するものであろう事がはば明らかである。

第 4 表 澱粉粒子の大小と生澱粉の糖化の難易

反応時間	粒子直径 (μ)	玉蜀黍澱粉	小麦澱粉 (液部)	小麦澱粉 (沈澱部)
		8.4~19.6	6	6~25.4
23		0.256(29.0%)	0.246(27.8%)	0.184(20.8%)
47		0.560(63.3%)	0.598(67.6%)	0.408(46.1%)
67		0.746(84.4%)	0.782(88.4%)	0.564(63.8%)

4) 黒麹アミラーゼの各種澱粉への吸着

澱粉資料には糯米、玉蜀黍、小麦(液部)、小麦(沈澱部)、甘藷、馬鈴薯の各澱粉を使用した。これら澱粉の生澱粉糖化の難易は既報^(1,2)の如く、列記順に糖化容易な澱粉から困難な澱粉に至る。

吸着要領：前々節に同じ。吸着度合を見る

ため、吸着残液の玉蜀黍生澱

粉糖化力を比較した。反応液の

組成：吸着残液 10 ml, M/10 ク

エン酸ソーダー塩酸緩衝液 (pH

3.6) 10 ml, 水道水 20 ml, 玉

蜀黍生澱粉 0.5 g, トルオール

第 5 表 各種生澱粉の吸着アミラーゼ量の比較

吸着剤	糯米	玉蜀黍	小麦 (液部)	小麦 (沈澱部)	甘藷	馬鈴薯	対 照 (未吸着 酵素液)
粒子直径 (μ)	5.6~7	8.4~19.6	6	6~25.4	12~20	40~200	
22	0.076	0.102	0.102	0.118	0.146	0.216	0.252
46	0.160	0.213	0.220	0.248	0.317	0.398	0.442
全糖 0.442 g							

第 6 表 黒麹アミラーゼの生澱粉糖化と pH との関係

1) アミラーゼ吸着澱粉												
吸着時 pH	3.0		3.6		4.2		5.0		6.0		7.0	
当初の澱粉 g	0.50		0.50		0.50		0.50		0.50		0.50	
残 澱 粉 g	0.21		0.20		0.26		0.43		0.46		0.46	
(グルコースとして)												
時 間	還元糖		還元糖		還元糖		還元糖		還元糖		還元糖	
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
18	0.146	70	0.152	76	0.143	55	0.052	12	0.037	8	0.009	2
42	0.196	93	0.196	98	0.213	82	0.095	22	0.069	15	0.024	5
66	0.206	98	0.196	98	0.260	100	0.155	36	0.115	25	0.032	7
2) アミラーゼ吸着残液												
吸着時 pH	3.0		3.6		4.2		5.0		6.0		7.0	
添加澱粉 g	0.25		0.25		0.25		0.25		0.25		0.25	
時 間	還元糖		還元糖		還元糖		還元糖		還元糖		還元糖	
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
18	0.066	29	0.067	30	0.088	39	0.139	62	0.123	55	0.038	17
42	0.157	70	0.173	77	0.189	84	0.211	94	0.202	90	0.060	27
66	0.224	100	0.226	101	0.226	101	0.224	100	0.225	100	0.089	40
3) pH 安定度												
pH	3.0		3.6		4.0		5.0		6.0		7.0	
添加澱粉 g	0.25		0.25		0.25		0.25		0.25		0.25	
時 間	還元糖		還元糖		還元糖		還元糖		還元糖		還元糖	
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
16	0.105	47	0.121	54	0.125	56	0.116	52	0.099	44	0.045	20
41	0.206	92	0.215	96	0.217	97	0.206	92	0.204	91	0.078	35
65	0.220	98	0.222	99	0.224	100	0.222	99	0.224	100	0.099	44

第 2 図 黒麹アミラーゼの生澱粉への吸着と pH との関係

(但し吸着アミラーゼ, 吸着残アミラーゼの場合は 18 時間の糖化率, pH 安定曲線では 16 時間の糖化率)

●—● 吸着残アミラーゼ ○—○ 吸着アミラーゼ
●—○ pH 安定曲線

化を行わせ, 残存の酵素力を測った。

(3) 対照: 各 pH の酵素液を玉蜀黍澱粉を加えず, トルオールのみを加えて, 30° に 18 時間静置したものの安定度を調べた。結果は第 6 表及び第 2 図の如し。

以上の事実より黒麹アミラーゼの生澱粉糖化の至適 pH は 3.6 附近で而もその pH でアミラーゼがよりよく生澱粉に吸着される事を知った。

考

察

以上の実験により生澱粉の糖化には吸着アミラーゼが関与する事を知った。而も各種生澱粉の糖化の難易と吸着アミラーゼ量との間には平行的関係がある事を見出した。Schwimmer 等⁽⁶⁾は麦芽 α-アミラーゼの生澱粉吸着に際して, 吸着量は澱粉の表面積に比例する事を報じているが, 著者の場合も一定資料のもの(小麦澱粉)では確かに粒子の大なるもの程アミラーゼの吸着量少いが, 異種澱粉間(玉蜀黍澱粉と小麦澱粉)ではアミラーゼ吸着量は各種澱粉特有の構造に由来し, 容易に糖化される澱粉程アミラーゼをよく吸着する事を知った。而して Schwimmer 等は糯玉蜀黍澱粉が粒子の表面積の割に異常に高いアミラーゼ吸着能を有する事を例外としているも, 恐らくこの澱粉は非常に容易に糖化されるものではなからうか。著者の場合, 糯米澱粉が黒麹アミラーゼをよく吸着し, 而もよく糖化される事より考え, 糸状分子(アミロース)を含みぬ澱粉構造がアミラーゼに対する吸着性, 被糖化性と関連性がある様に思える。然しながらアミロースを 21~24% 含むといわれている⁽⁹⁾馬鈴薯, 玉蜀黍の両澱粉間に黒麹アミラーゼに対する著しい態度の相異が見られる事は澱粉粒の構造中に於けるアミロースの存在様式が問題となるのではなからうか。又, アミラーゼの澱粉への吸着が単なる吸着か, 酵素-基質複合体の如きものかは更に考究を要する問題である。

要

約

黒麹アミラーゼを生澱粉に作用せしめ次の事が明かとなった。

(1) 生澱粉の糖化は吸着アミラーゼにより行われる。

(2) 各種生澱粉の糖化の難易は生澱粉へのアミラーゼ吸着量と平行関係にあって, アミラーゼを吸着しやすい澱粉ほど容易に糖化される。

(3) 黒糖アミラーゼの生澱粉の糖化至適 pH は 3.6 附近で, この pH では吸着アミラーゼ量も亦最高であった。

本研究に対し終始御懇篤な御指導, 御鞭撻を頂いた山崎何恵教授に厚く感謝します。又澱粉資料の恵与をうけた日本澱粉株式会社に深謝します。

0.5 ml, 反応経過は第 5 表の如し。

この表から明かな様に糖化されやすい生澱粉程アミラーゼをより多量に吸着することが明かとなった。

5) 黒麹アミラーゼの生澱粉への吸着と pH

吸着操作は前節に準じ, 玉蜀黍生澱粉を使用し, 種々の pH にて吸着せしめた。吸着温度, 吸着時間は生澱粉分解条件と同じにするため 30° にて 18 時間吸着せしめた。

(1) アミラーゼ吸着澱粉は夫々の吸着時の pH 緩衝液の 3 倍稀釈液 15 ml で 8 回洗滌し, これを pH 3.6 の緩衝液 20 ml を含む水道水 40 ml 懸濁して 30° にて糖化を行わせた。

(2) 吸着残液は吸着の間に生成された還元糖をミクロベルトラン法にて定量し, それに応じて各残部に略同濃度の糖分を含む様に葡萄糖を補添した後, 各 10 ml ずつを緩衝液で pH 3.6 に揃え, 水道水で全容 40 ml となし, 玉蜀黍生澱粉 0.25 g を加え, 30° にて糖

- (1) 山崎何恵, 上田誠之助 : 本誌, 24, 181 (1951).
 (2) S. Ueda : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20, 148 (1956).
 (3) S. Ueda : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, No. 5 (1957).
 (4) O. Holmberg : *Biochem. Z.*, 258, 134 (1933).
 (5) S. Schwimmer, A. K. Balls : *J. Biol. Chem.*, 176, 465 (1948).
 (6) S. Schwimmer, A. K. Balls : *J. Biol. Chem.*, 180, 883 (1949).
 (7) 徳岡有三 : 本誌, 13, 586 (1937).
 (8) 北原覚雄, 久留島通俊 : 醸工, 28, 442 (1950).
 (9) F. L. Bates, D. French, R. E. Rundle : *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 142 (1943).

黒麹菌の Amylolytic System に関する研究 (第 4 報)*

各種黒麹菌による生澱粉の糖化

上 田 誠 之 助 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 5 月 24 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾に於て黒麹アミラーゼが黄麹、麦芽アミラーゼに比し生澱粉を特異的に分解する力が顕著であり、而も吸着アミラーゼが糖化に関与する事⁽²⁾を報じたが、本報では当教室保管の黒麹菌数株につき澱粉溶液糖化力と生澱粉分解力とを比較した結果を報告する。

実 験 の 部

酵素液 各種黒麹菌の 4 日間 30° 培養の麹麴の 10% 水道水抽出液。

澱粉溶液糖化試験 0.8% 可溶性澱粉溶液 10 ml, 緩衝液 (M/10 クエン酸ソーダー塩酸 pH 3.8) 2 ml, 酵素液 2 ml, 全容 14 ml, 50°C にて反応せしむ。5 分, 10 分後の還元力の増加を反応液 1 ml につきマイクロベルトラン法で葡萄糖として定量した。又同時に反応液の沃度呈色反応を検した。

生澱粉糖化試験 玉蜀黍生澱粉 0.5 g, 緩衝液 (前節に同じ, pH 3.6) 10 ml, 酵素液 5 ml, 水道水 25 ml, 全容 40 ml に更にトルオール 1 ml を加え 30° にて反応せしめ, 所定時間後, 反応濾液 1 ml につきマイクロベルトラン法にて還元力の増加を葡萄糖 mg にて示した。

供試菌

No. 1 <i>Aspergillus Saito</i>	No. 2 <i>Aspergillus niger</i> (K 221)
No. 3 <i>Aspergillus niger</i> (K 222)	No. 4 <i>Aspergillus niger</i>
No. 5 <i>Aspergillus batatae</i> Saito	No. 6 <i>Aspergillus Usamii</i>
No. 7 <i>Aspergillus Kinjyo</i>	No. 8 <i>Aspergillus awamori</i> Nakazawa
No. 9 <i>Aspergillus awamori</i> var. kawachii	

(1) 各種黒麹菌アミラーゼの澱粉溶液糖化力と生澱粉分解の比較 : 第 1 表で明かな様に澱粉溶液糖化力に比し生澱粉分解力顕著な No. 7, 8, 9 は何れも菌叢褐色で坂口氏等⁽³⁾及び岡崎氏⁽⁴⁾の分類によれば *Awamori* type に属し, 他は菌叢黒色の *Usamii* type に属する事は興味ある事実で黒麹菌分類の 1 つの key になりうるのではないかと考えられるも更に多数の黒麹菌につき精査したい。

(2) 澱粉溶液糖化力と生澱粉分解力とが比例せぬ原因の追究 : *Aspergillus Usamii* のアミラーゼ系が澱粉溶液の糖化力, 液化力共に *Aspergillus awamori* var. kawachii に勝るにもかかわらず, 生澱粉分解力が劣る原因を追究した。第 3 報⁽²⁾に於て生澱粉分解に与るアミラーゼは主として吸着アミラーゼである事を知ったので, 両菌株につき吸着アミラーゼによる生澱粉分解を比較した。

(イ) 吸着アミラーゼによる生澱粉分解 両菌株の酵素液は前節力価のものを使用した。生澱粉分解の至適

* Studies on the Amylolytic System of Black-koji Molds. Part IV. Comparative Study of Various Black-koji Molds on Raw Starch Digestion.
 Seinosuke UEDA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)