- (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)

第 1 表 各種黒麹菌の糊化澱粉糖化力と生澱粉分解力

菌株 No.	澱粉溶液			玉蜀黍生澱粉			生澱粉 分解順 位
	澱粉溶 液糖化 力順位*	糖化時間(分)		分 解 時 間			
		5	10	13	39	63	
⑥	1	2.75黃**	3.38	3.78	9.86	11.04	5
④	2	2.58黃	3.28	2.67	8.00	10.70	7
①	3	2.50黃	3.11	3.94	10.30	11.02	4
⑤	4	2.05黃	3.33	3.44	9.06	11.00	6
⑦	5	1.43黃	2.23	4.33	10.41	11.00	2
⑧	6	1.35黃	2.20	4.00	9.58	11.04	3
⑨	7	1.30黃褐	2.10	4.38	10.62	11.06	1
③	8	0.68紫	1.13	2.58	7.44	9.68	8
②	9	0.45紫	0.73	1.80	5.34	8.36	9

* 糖化時間 5 分で比較した ** 粘度反応の呈色
Glucose mg/ml

第 2 表 吸着アミラーゼによる生澱粉分解

時間	<i>Asp. awamori</i> var. <i>kawachii</i>	<i>Asp. Usamii</i>
21	7.28	6.39
45	13.72	12.66
69	17.72	16.52

Glucose mg/ml

第 3 表 透析の影響

菌株	澱粉溶液		生澱粉	
	5 分	10 分	17 時間	41 時間
<i>Asp. Usamii</i>	2.18黄	3.19黄	4.40	10.00
<i>Asp. awamori</i>	0.97黄褐	1.89黄	5.33	11.00

第 4 表 塩析の影響

菌株	澱粉溶液		生澱粉	
	5 分	10 分	18 時間	40 時間
<i>Asp. Usamii</i>	2.25	3.19	5.62	10.84
<i>Asp. awamori</i>	1.09	2.16	6.30	11.00

Glucose mg/ml

第 5 表 酵素抽出液を処理したものの影響

処理方法	時間	16	38
熱処理		3.82	8.40
トルオール処理		3.76	8.66
無処理		3.90	8.66

Glucose mg/ml

200 ml 酵素抽出液の硫酸 0.5~0.8 飽和の間の沈澱を水道水 20 ml に溶解し透析後、100 ml に希釈して酵素液とした。その澱粉溶液、生澱粉糖化力は第 4 表に示した。

塩析アミラーゼによっても両菌株間の澱粉溶液糖化力と生澱粉分解力は平行しなかった。

(二) *Aspergillus Usamii* 酵素液の熱処理物、トルオール処理物の影響

もしも *Asp. Usamii* の酵素抽出液中の不純物によってアミラーゼの澱粉への吸着が阻害されるものなら酵素抽出液の熱処理物とかトルオール変性物の添加で *Asp. awamori* var *kawachii* の酵素抽出液の活性に影響を与える筈である。

(1) 熱処理 : *Asp. Usamii* の酵素液を 30 分間煮沸し冷却後原容にかえす。

(2) トルオール処理 : *Asp. Usamii* の酵素抽出液 50 ml 及びトルオール 5 ml を入れた 250 ml 容振盪瓶を 21°, 48 時間振盪し、アミラーゼを完全に失活させた。

(3) 生澱粉分解法は前述の如く行う。但し処理液 5 ml 添加のものはそれだけ水道水の量を減じた。 *Asp. awamori* var. *kawachii* の酵素抽出液に対する処理液の影響の結果は第 5 表の如し。

Asp. Usamii の酵素抽出液を熱処理したもの、トルオール処理したものは何れも *Asp. awamori* var. *kawachii* の酵素抽出液による生澱粉の分解を阻害しない事を知った。

* 遠心管は予め秤量し澱粉に附着した洗液量だけ減じて加える。

pH は何れも 3.6 附近である事を予備実験で知った。吸着操作は次の如し。酵素液 10 ml, 緩衝液 (M/10 クエン酸ソーダー-塩酸 pH 3.6) 20 ml, 水道水 50 ml を玉蜀黍澱粉 2.0 g に加え、室温 (約 12°) にて 3 時間、時々攪拌しつつ放置し、遠心分離にかけ、沈下した澱粉は 10 倍稀釈緩衝液 (pH 3.6) 40 ml で 2 回洗滌し、80 ml* の緩衝液に懸濁しトルオールの存在下 30° にて糖化を行わせた。結果は第 2 表の如し。

この表より明かな様に *Aspergillus Usamii* は *Aspergillus awamori* var. *kawachii* に比し吸着アミラーゼ量が少い事を知った。それ

故 *Aspergillus Usamii* の酵素液の場合生澱粉への吸着アミラーゼ量が少い原因が不純物による吸着阻害かアミラーゼの本質的相異によるものか追究を行った。

(ロ) 透析の影響 酵素液を 1 夜流水にて透析した。その結果全窒素が *Aspergillus Usamii* の酵素液では 65.0 mg/100 ml が痕跡に、又 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* のそれでは 36.8 mg/100 ml が 7.0 mg/100 ml に減少した。

澱粉溶液糖化力と生澱粉分解力との比較は第 3 表の如し。

第 3 表に見られる如く透析しても両者の関係は変らなかった。

(ハ) 塩析の影響 硫酸塩析で 0.5~0.8 飽和の間にアミラーゼが大部分塩析される事を知ったので、この部分の酵素につき検討した。

第 6 表 可溶性澱粉とグリコーゲンの比較

分	可溶性澱粉		グリコーゲン	
	<i>Asp. Usamii</i>	<i>Asp. awamori</i>	<i>Asp. Usamii</i>	<i>Asp. awamori</i>
5	2.01 黄褐	1.00 褐	0.90	0.80
10	3.46 黄	1.94 黄褐	1.42	1.30
30	4.89	4.00	2.40	2.30
60	5.53	4.75	2.80	3.08

Glucose mg/ml

第 7 表 両菌株の糖化型アミラーゼ区分の比較

時 間	可溶性澱粉		β -LD (グリコーゲン)		玉蜀黍生澱粉*		
	10分	20分	20分	60分	17時 間	41時 間	65時 間
<i>Asp. Usamii</i>	37.2	51.2	10.4	25.4	9.1	13.5	16.6
<i>Asp. awamori</i>	19.0	37.2	12.4	35.0	13.6	18.0	21.6

* この場合 *Asp. awamori* の酵素液を 2 倍量用い糊化澱粉に対する力価を *Asp. Usamii* と同じにした。
糖化率%で示す。

(ホ) グリコーゲンへの作用

反応液の組成： 1% 基質溶液 10 ml, 緩衝液 (pH 3.8) 2 ml, 蒸留水 2 ml, 酵素抽出液 2 ml, 全容 16 ml, 50° にて反応結果は第 6 表の如し。

第 6 表より明かな様に可溶性澱粉では半分の力価しかもたぬ *Asp. awamori* var. *kawachii* の酵素抽出液がグリコーゲンでは殆んど *Asp. Usamii* と同様の力価を示している。この事より *Asp. Usamii* と *Asp. awamori* var. *kawachii* の両酵素液に於ける澱粉溶液糖化力と生澱粉分解力とが比例しない事の原因は恐らく糖化型アミラーゼ区分の“debranching activity”に関係し、*Asp. Usamii* ではこの activity が少いと思われる。

(ヘ) *Asp. Usamii* と *Asp. awamori* var. *kawachii* の各糖化型アミラーゼ区分の比較 前節に於て両菌株の澱粉溶液糖化力と生澱粉分解力とが比例せぬ原因として恐らく糖化型アミラーゼ区分中の“debranching factor”に起因するものであろうことが推定されたので両菌株の糖化型アミラーゼにつき比較した。糖化型アミラーゼの調製法は第 2 報⁽⁶⁾に準じた。即ち *Asp. Usamii* では pH 7.8, 60°, 15 分間, *Asp. awamori* var. *kawachii* では pH 2.2, 60°, 15 分間処理で糖化型アミラーゼ区分を分取した。可溶性澱粉, グリコーゲンの β -limit dextrin, 生澱粉への作用結果は第 7 表の如し。

この表より明かな様に *Asp. Usamii* の糖化型アミラーゼ区分は澱粉溶液糖化力に比し β -limit dextrin (glycogen), 生澱粉分解力が弱い。即ち“debranching activity”の弱い事が生澱粉分解力の弱い原因であることを知った。

要 約

以上の事より次の事が判明した。

- (1) 9 株の黒麹菌の澱粉溶液糖化力と生澱粉分解力とを比較し両力価が平行しない事を知った。
- (2) *Aspergillus awamori* 型の菌叢褐色のものが澱粉溶液糖化力に比し生澱粉分解力強力である事を知った。
- (3) *Asp. Usamii* が澱粉溶液糖化力(液化力も)が強いにも拘らず、生澱粉分解力が弱い原因が不純物による阻害ではなく、糖化型アミラーゼ区分中の“debranching activity”に起因する事を知った。

本実験を行うにあたり終始御懇篤なる御指導をいただいた山崎何恵教授に感謝します。

- (1) 山崎何恵, 上田誠之助：本誌, 24, 181 (1951).
- (2) 上田誠之助：本誌, 31, 898 (1957).
- (3) 坂口謹一郎, 飯塚 広, 山崎千二：応用菌学, 3, 97 (1950).

- (4) 岡崎 浩：本誌, 24, 88 (1950).
- (5) S. Ueda：Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 20, 148 (1956).

以上の実験から *Asp. Usamii* の酵素抽出液が澱粉溶液糖化力に比し生澱粉分解力が弱い原因が、酵素抽出液中の不純物によるアミラーゼの生澱粉吸着阻害によるものではなく、何等か酵素の本質なものである事が考えられる。

一方第 2 報⁽⁵⁾に於て報じた様に *Asp. awamori* var. *kawachii* 糖化型アミラーゼ区分に生澱粉に吸着されやすい“debranching factor” (恐らくアミラーゼか) があって、これが生澱粉分解の大きな factor である事を見出したので、この factor が *Asp. Usamii* では少いのではないかと思考される。もしそうであるならば α -1, 6-glucosidic linkage の多いグリコーゲンを基質とした場合可溶性澱粉と異なる糖化経過を示す事が考えられる。次にグリコーゲンへの作用を調べた。