細菌アミラーゼに関する研究 (第 15 報)*

細菌アミラーゼの産生機構 (その 1)

洗滌細胞によるアミラーゼの産生条件

福本寿一郎, 山本武彦 (大阪市立大学理工学部)

昭和 31 年 12 月 13 日 受理

緒 言

細菌の分泌する α -Amylase (Amylo-(1, 4)-dextrinase)⁽¹⁾ は澱粉分解型式の点から二、三種類に別けられるが^(2,3), その中現在広く実用に供され, 又古くから詳細に研究されているのは著者等が細菌液化型アミラーゼ^{(9)**}と呼んでいるものである。

細菌液化型アミラーゼ (Amylase) (以下単に細菌アミラーゼと呼ぶ) が如何なる機構によって細菌細胞により形成, 分泌 (産生) されるかを明かにすることは単に酵素蛋白の生合成に関する見地から興味あるのみならず, 細菌アミラーゼの工業的生産の上にも極めて重要な問題である。細菌アミラーゼの産生に関しては古くから多数の研究が行われているが, 然し従来の研究は主として培養実験によるものであった。それ等について見られる主な結果を挙げると, 細菌アミラーゼの産生には培養液が終始中性附近に保たれること, 比較的過剰の窒素源の存在が好ましいこと, 炭素源としては澱粉が勝れていること, 比較的著量の磷酸塩の添加が好結果をもたらすこと, 菌々の金属の中 Ca が最も酵素産生に有効である等⁽⁴⁻⁹⁾ のことである。然し培養実験では必然的に細胞の増殖或は自己消化が行われ, またそれに伴って pH の変化, 代謝産物の蓄積等が起るため最初と与えた試験条件が果してアミラーゼ産生に直接影響したのかどうかを判定することは極めて困難である。

著者等はアミラーゼ産生細菌 *Bac. amyloliquefaciens* Fukumoto の振盪培養実験に於てアミラーゼの増加曲線は細胞の増殖曲線より時間的に遅れること, 又細胞増殖量が最高に達した後に於ても, 炭素源の消費が行われる間はアミラーゼの増加が認められること (第 1 図), 一方培養の如何なる時期の該細菌細胞を洗滌後休止せしめても, 或は種々条件下で自己消化せしめても, 或はまた細胞を磨砕してもアミラーゼの増加は勿論, その存在さえ殆んど認められぬこと, 然しある時期の洗滌細胞は磷酸塩存在に於て炭素源を加え, 好氣的に振盪すれば何等窒

素源を加えなくともかなりのアミラーゼを産生する等のことが判明した。之等の事実は細菌アミラーゼの産生は細胞増殖そのものに並行, 随伴するものではなく, またアミラーゼは一旦細胞内に形成され, それが細胞の自己消化と共に培養液中に放出されるものでもなく, それはある時期の生細胞が呼吸による力源代謝と共軌して, 主としてある種細胞内蛋白をいわば再編成乃至転化することによって行われるものであることを示唆するように思われる。

勿論洗滌細胞と云っても生細胞を用いる以上, 必然的に細胞の所謂生活作用は悉く機能していると見做さねばならないため, 事態はなお複雑であるが, 然し洗滌細胞を用いてアミラーゼの生成実験を行うことは培養実験によるよりも遙かに明確であり, 而も細菌アミラーゼは或時期の細胞によって形成分泌されるものである, それは細胞生理との関連に於て極めて意義

第 1 図 *Bac. amyloliquefaciens* Fukumoto の振盪培養

(300 cc 容フラスコに澱粉, 磷酸アンモニウム添加大豆粕培養液 40 cc を容れて培養, 37°)

* Studies on Bacterial Amylase. Report XV. Formation of Bacterial Amylase. Part 1. Some Conditions of the Enzyme Formation by Suspensions of Washed Bacterial Cells. Juichiro FUKUMOTO and Takehiko YAMAMOTO (Institute of Polytechnics, Osaka City University)

** 細菌糖化型と著者等が呼んでいるアミラーゼの産生機構は細菌液化型アミラーゼのそれとはかなり異なるようである。本報では前者のそれについては触れないことにする。

あるように思われる。

本報では洗滌細胞を用いてアミラーゼを産生させる場合の必要条件について報告する。

実 験 の 部

1. 洗滌細胞の調製及び実験法

アミラーゼ産生細菌 *Bac. amyloliquefaciens* Fukumoto を合成培養基（可溶性澱粉 4%, 酒精 1%, クエン酸ソーダ 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, KCl 及び CaCl_2 各 0.01%, 水道水, pH 7.0）又は澱粉, 燐安添加大豆粕培養基 [5% 大豆粕浸出液（大豆粕に 0.2% NaOH を 20 倍量加え, 1 時間煮沸, のち HCl にて中和濾過せるもの）に細菌アミラーゼで液化した澱粉 3%, 酒精 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及び KCl 各 0.02% を添加, pH 7.0] に, 静置培養の場合は 5 l 容フェルンパッハフラスコ（培養液 800 cc）で特に明示する以外は 38 乃至 45 時間（産膜後約 18 時間）, 振盪培養の場合は 500 cc 容フラスコ（培養液 50 cc）で 37° で 16 乃至 20 時間培養した後, 細胞を遠心沈降法で洗滌した。この際洗滌を十分ならしめるため, 毎回沈降細胞に 5 乃至 6 倍量の煮沸殺菌水道水を加え, 共栓フラスコに移し烈しく約 5 分間振盪した後, 遠心分離し, それを乳鉢にて磨砕し, 再びそれに水を加え, 上述操作を繰返した。このようにしてその洗滌液が Nessler 氏試薬にて呈色しなくなるまで洗滌した。通常 7 乃至 8 回洗滌を繰返すと上記呈色反応はみられなくなる。なお一般に静置培養した菌体は細胞塊の磨砕が多少煩雑であるが, 遠心沈降の状態がよく, 一方振盪培養した菌体は初回の遠心分離に於てやや沈降不良の細胞があるが, 然し次回からの沈降状態は良好で且つ乳鉢磨砕の必要はない。洗滌を終った菌体は最後に蒸留水に懸濁した。

アミラーゼの測定は Lintner-Sollied^(10,11) 法の変法によった。この方法による酵素力 1 単位は 10 cc 中に懸濁した馬鈴薯澱粉 1 g を糊化後, 65° に於て 15 分でその粘度を 10% 蔗糖液のそれとほぼ等しくせしめる酵素力 (LSV) で, 又それは 1% 可溶性澱粉液 10 cc に作用して 40°, 60 分間でその沃度反応を橙赤色にまで変化せしめる⁽¹²⁾。

2. 実験結果

i) 洗滌細胞によるアミラーゼ産生に対して必要な条件 : 先ず洗滌細胞によるアミラーゼ産生の最小必要条件を知るため, 洗滌細胞に麦芽糖又は燐酸塩或はその両者を同時に加え, 37° で好氣的に或は嫌氣的に振盪し, 経時的にその振盪液のアミラーゼ力を測定した。その結果を第 1 表に示す。即ち嫌氣的条件下ではい

第 1 表 洗滌細胞によるアミラーゼの産生

(細胞, 乾物量として 56 mg/25 cc)

	嫌 氣 的*				好 氣 的**			
	—	+	—	+	—	+	—	+
燐酸塩(終濃度, M/15)	—	+	—	+	—	+	—	+
麦芽糖(終濃度, 1%)	—	—	+	+	—	—	+	+
アミラーゼ力/cc								
2 時間後	0.2	0.3	0.1	0.2	1.0	2.0	2.0	3.0
4 "	0.2	0.3	0.1	0.2	2.0	4.0	2.5	9.0
6 "	0.2	0.3	0.1	0.2	3.0	6.0	3.0	20.0
8 "	0.2	0.3	0.1	0.2	3.0	7.0	3.0	29.0

* 気相は窒素ガスとし, 密栓した。

** 通常の振盪培養と同じく稀栓

第 2 表 呼吸阻害剤の影響

(燐酸塩 M/12, 可溶性澱粉 1%, 細胞, 乾物量として 86 mg, 全容 25cc, pH 6.8, 37°)

阻害剤(終濃度)	無	KCN (M/300)	Na_3AsO_3 (M/300)	CH_3COOH (M/600)	NaN_3 (M/300)	NaF (M/40)
呼吸能, QO_2^*	57	3	16	7	8	56
アミラーゼ力/cc						
振盪 6 時間後	20	0.1	0.1	0.1	0.1	21
" 20 "	31	2.0	0.1	1.0	0.1	29

* 細胞懸濁液に先ず可溶性澱粉, 燐酸塩を, 次いで阻害剤を加えて上記組成とした後直ちにその 2 cc を Warburg フラスコにコ探り酸素吸収を測定した。 QO_2 は振盪 15 分から 45 分までの 30 分を基礎にして算出した。

第 3 表 緩衝剤の種類とアミラーゼ産生

(細胞, 乾物量として 76 mg/15 cc, 可溶性澱粉 1%)

緩 衝 剤 (終濃度)	無	Phosphate (M/15)	Borate (M/15)	Citrate (M/15)	Lactate (M/10)	Acetate (M/10)	Malonate (M/15)
初 発 pH	6.8	6.8	7.5	6.6	6.8	6.6	6.6
12 時間後 pH	6.6	6.8	7.5	7.0	7.4	6.6	6.8
アミラーゼ力/cc	0.1	31	0	0.2	17	11	22

ずれの場合もアミラーゼの産生は認められない。又好氣的振盪の場合に於ても細胞のみの場合は勿論, 麦芽糖又は燐酸塩を夫々添加しただけでは僅しか認められない。然し麦芽糖と燐酸塩とを同時に添加したものでは可成りのアミラーゼ産生が行われることが知られる。

次に好氣的条件が果して呼吸との関係に於て必須であるかどうかを知るため, 呼吸阻害剤の影響を試験した(第 2 表)。即ち cytochrome oxidase 等の阻害剤として著名な cyanide, azide や succinic dehydrogenase 等を阻害する arsenite, また isocitric dehydrogenase や種々の -SH 酵素を阻害する monoiodo acetic acid 等により, 呼吸が抑制されると同時にアミラーゼ産生も阻害されることからアミラーゼ産生は明かに

第 2 図 アミラーゼ産生の至適 pH 及び温度

ミラーゼ産生と略々等しくなることが判明した (第 2 図)。

次に第 1 図の実験に於て使用した phosphate が緩衝剤として有効であるのかどうかについて検討した (第 3 表)。既に述べた如くアミラーゼ産生の至適 pH はほぼ中性附近にあるので、第 3 表に示した緩衝剤の中にあるものはその緩衝能範囲外であるが、それ等も一応中性附近になるよう調節した。第 3 表から明かな如くアミラーゼ産生は phosphate の場合に最大で、borate, citrate 緩衝液の場合には殆んど認められない。Lactate, acetate, malate の場合には或程度認められるが phosphate には及ばない。之等結果から phosphate は緩衝作用以外の点でアミラーゼ産生に好影響をもたらすものと考えられる。之等については後報に詳細に報告する。

之までの実験に於て洗滌細胞によるアミラーゼ産生に対し、可溶性澱粉、麦芽糖等が有効であることが判明したが、それ以外にも例えば焦性葡萄糖、コハク酸、グルコン酸等の有機酸、アラビノース、ガラクトース、ラクトース等の糖類や、マンニット等も有効であることが判明した。なおグルコース、シュクロース等は殆んど効果がなかった。

次に供試細胞の age と洗滌細胞にした場合のアミラーゼ産生力との関係について検討した。予め培養基に

第 3 図 炭素源の種類とアミラーゼ産生
(細胞、乾物量として 72 mg; 燐酸塩 M/12; 炭素源 0.5%; 全容 15 cc, pH 6.6, 37°)

呼吸そのものとの関連に於て必要であることは明かである。なお enolase はじめ種々の Mg を必要とする酵素の阻害剤である NaF によっては呼吸もアミラーゼ産生も阻害されないことが知られる。

洗滌細胞によるアミラーゼ産生の至適 pH は 6.6 又温度は 37° (第 2 図) でほぼ培養の場合のそれ等に一致する。なお温度に関しては 40° の場合、振盪初期に於けるアミラーゼ産生は良好であるが、持続性がなく、一方 34° の場合は初期に於てはさほど良好ではないが長時間後には結局 37° の場合に見られるア

ミラーゼ産生力とを比較した。即ち第 4 表から明かな如くまだ培地中にアミラーゼをさほど分泌していない比較的培養初期の細胞が最も菌体当りのアミラーゼ産生力が大である。なお種々の点から細胞のアミラーゼ産生能の最大時期を見分けるには、培養時間或は菌の繁殖状態の観察等より培養液中のアミラーゼ力 (第 1 図) が最も好都合な指標であることが判った。通常その時期は本実験で用いた培養基に於ては、培養液のアミラーゼ力が 100~150 LSV/cc に達した頃である。なお第 4 表から知られるように、静置培養した菌体と振盪培養したそれとはアミラーゼ産生力に大差が認められない。合成培養基と澱粉燐安添加大豆粕培養との間でも同様でその間には殆んど差が認められなかった。

最後に細胞を洗滌する場合の洗滌液について検討し

第 4 表 細胞の Age とアミラーゼ産生力

培養時間	静置培養菌体*					振盪培養菌体*		
	20	44	68	92	116	18	24	40
培養液のアミラーゼ力/cc	20	140	320	710	890	205	520	960
試験時の洗滌細胞量 mg/cc**	4.1	3.9	4.6	4.7	3.1	3.2	4.1	2.6
振盪 8 時間後の アミラーゼ力/cc	19	22	17	16	7	16	16	8
	(2)	(4)	(3)	(5.5)	(4)	(3)	(4)	(3)
細胞 1mg 当りの アミラーゼ産生力***	4.2	4.6	3.2	2.2	1.0	4.1	2.9	1.9

* 澱粉, 磷酸アンモン添加大豆培養液

** 可溶性澱粉 1%; 磷酸緩衝液 M/12 (pH 6.8); () 内数値は対照として可溶性澱粉を加えない場合の値

*** 対照を差引いた値

第 5 表 細胞の洗滌方法とアミラーゼ産生

培養時間*	28			34			48		
	22			86			380		
試験時の細胞量*** mg/cc	a**	b	c	a	b	c	a	b	c
	1.2	1.5	1.6	2.9	3.1	3.1	4.1	4.1	4.4
振盪 6 時間後の アミラーゼ力/cc	5	9	10	12	13	13	15	16	15
	(2)	(3)	(3)	(3)	(3)	(4)	(3)	(4)	(4)
細胞 1mg 当りの アミラーゼ産生	2.5	4.0	4.4	3.1	3.2	2.9	2.8	2.9	2.7

* 澱粉, 磷酸添加大豆培養液, 静置培養

** a. 蒸溜水, b. 水道水, c. 0.9% 水道水にて夫々洗滌

*** 振盪液の組成, () 内の数値, アミラーゼ産生力の表示法は第 4 表に同じ

た。即ち age の異なる細胞を夫々遠心分離し、乳鉢にて磨砕した後、煮沸殺菌水道水を加えて懸濁液とし、それを各々 3 等分し、それ等を既に述べた方法に従って蒸溜水、0.9% 食塩水或は煮沸殺菌水で夫々洗滌を繰り返した後、それ等のアミラーゼ産生力を比較した。第 5 表から明かなように 28 時間培養（培養初期）の細胞は蒸溜水洗滌の場合他の洗滌の場合に比しアミラーゼ産生力はかなり低下するが 34 時間（培養中期）以後の細胞はさほど顕著な差は認められない。なお煮沸殺菌水道水洗滌細胞と 0.9% 食塩水洗滌細胞との間にも大差は認められなかった。また蒸溜水洗滌の場合、洗滌液が Nessler 氏試薬反応（薄緑色）を示さなくなるまで行うことは極めて困難であった。

要 約

Bacillus amyloliquefaciens Fukumoto

による細菌アミラーゼの産生機構を知るため、先ずその洗滌細胞を用いた場合のアミラーゼ産生条件について検討した。その結果次のことが判明した。

1. 洗滌細胞は窒素源の添加がなくとも磷酸塩及び適当な炭素源の存在下に好氣的に保たれるならばアミラーゼを産生する。
2. その際の好氣的条件は細胞の呼吸に必要なためである。
3. 磷酸塩は緩衝作用以外に何等かの効果をもたらす。
4. 炭素源としては種々の有機酸、糖類、多糖類等かなり広範囲に亘る物質が有効であるがその効果には著しい差がある。
5. アミラーゼ産生力は logarithmic phase 後期の細胞が最も強い。

- (1) E. Schubert : *Melliand Textil Acta*, No. 8, 1 (1954).
- (2) K. Kneen, L. D. Beckord : *Arch. Biochem.*, 10, 41 (1946).
- (3) 福本寿一郎, 山本武彦, 市川和宏 : 酵素化学シンポジウム, 8, 40 (1953).
- (4) L. Wallerstein : *Ind. Eng. Chem.*, 31, 1218 (1939).
- (5) 福本寿一郎 : 本誌, 19, 689, 789 (1943).
- (6) 照井堯造 : 醸工誌, 26, 147 (1948); 27, 289 (1949).
- (7) B. S. Lulla : *Biochim. et Biophys. Acta*, 7, 244 (1951).
- (8) 福岡甲子郎, 原田雅之, 小田雅夫 : 醸工誌, 32, 243 (1954).
- (9) 萩原文二 : *Ann. Rep. Scient. Works, Fac. Sci. Osaka Univ.*, 2, 35 (1954).
- (10) C. J. Lintner, P. Sollied : *Z. ges. Brau.*, 26, 103 (1903).
- (11) 福本寿一郎 : 本誌, 19, 487 (1943); 大阪工業研究所報告, 9 (1944).
- (12) 山本武彦 : *Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan)*, 19, 121 (1955).